

**Isolation und Eigenschaften
biologisch aktiver F Pili des
Enterobacteriums Escherichia Coli K-12**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Reiner Helmuth
aus Andernach/Rhein**

Berlin 1977
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549022_0036

ISOLATION UND EIGENSCHAFTEN
BIOLOGISCH AKTIVER F PILI DES
ENTEROBACTERIUMS ESCHERICHIA COLI K-12

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Reiner Helmuth
aus Andernach/Rhein

Berlin 1977

1. Gutachter: Professor Dr. T.A. Trautner

2. Gutachter: Professor Dr. E.R. Lochman

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 1977



Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem in der Zeit vom April 1974 bis April 1977 angefertigt.

Ich möchte mich besonders bei Dr. Mark Achtman bedanken, dessen Betreuung sich durch wissenschaftliches Engagement und persönlichen Einsatz auszeichnete. Auch Professor Dr. T.A. Trautner bin ich zu Dank verpflichtet. Er hat sich kritisch und konstruktiv mit den gewonnenen Ergebnissen auseinandergesetzt und die Möglichkeiten zur Bearbeitung dieses Themas in seiner Abteilung geschaffen.

Dr. Georg Stöffler danke ich für die Herstellung der Antiseren und Herrn Brauer für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Bei Dr. Giovanna Morelli bedanke ich mich für die Einführung in die Techniken der Elektronenmikroskopie und bei Dr. Claus Edelbluth für viele nützliche Hinweise zur Durchführung der biochemischen Untersuchungen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors Achtman und der Abteilung Trautner bedanken.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>1. <u>Einleitung</u></u>	1
<u>2. <u>Material und Methoden</u></u>	9
2.1. Abkürzungen	9
2.2. Medien, Platten, Chemikalien	10
2.2.1. Flüssige Medien	10
2.2.2. Feste Medien	11
2.2.3. Chemikalien	12
2.3. Genetische Methoden	12
2.3.1. Bakterienstämme	12
2.3.2. Bakteriophagen	14
2.3.3. Wachstumsbedingungen	14
2.3.4. Zelltitelbestimmungen	15
2.4. Biochemische Methoden	15
2.4.1. Puffer und Lösungen	15
2.4.2. Präparation der Dialyseschläuche	16
2.4.3. Caesiumchlorid Dichtegradienten	16
2.4.4. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	17
2.4.5. Proteinfärbung der Gele	19
2.4.6. Dichteanalyse	19
2.4.7. Aminosäureanalyse	20
2.5. Elektronenmikroskopie	21
2.6. Bestimmung des F Pilusgehaltes einer Probe	21
2.6.1. Elektronenmikroskopisch	21
2.6.2. Gelelektrophoretisch	23

	Seite
2.7.	Immunologische Methoden 25
2.7.1.	Antiserumgewinnung 15
2.7.2.	Isolation F Pilus spezifischer Antikörper 25
2.8.	Biologische Tests isolierter F Pili 26
2.8.1.	Test auf Bindung an F ⁻ Zellen 26
2.8.2.	Test auf Bindung "männlich spezifischer" Bakteriophagen 27
<u>3.</u>	<u>Versuche und Ergebnisse</u> 29
3.1.	Versuche zur Vermehrung der F Pilus- ausgangsmenge. 29
3.1.1.	Die meisten F Pili werden am Beginn der stationären Wachstumsphase produ- ziert und geißellose Wirtsstämme sind geißeltragenden vorzuziehen. 29
3.1.2.	Isolation einer <u>Flac</u> Mutante mit höherer F Pilusausgangsmenge. 30
3.1.3.	Auch das Wachstumsmedium hat einen Einfluß auf die F Pilusmenge. 32
3.1.4.	Die Mutante trägt doppelt so viele zellgebundene F Pili und verliert sie nicht in der stationären Wachstumsphase. 33
3.1.5.	Die Mutation kartiert im <u>tra</u> Operon. 36
3.2.	Die F Pilusisolationismethode. 40
3.2.1.	Beobachtungen bei der Entwicklung der Isolationismethode. 40

	Seite
3.2.2. Beschreibung der Isolationsmethode anhand einer Wildtyp F Pilusisolation.	41
3.2.3. Es werden 2 mg Wildtyp F Pili von 99 % Reinheit isoliert.	52
3.2.4. Die Wildtyp F Pili haben eine Dichte von 1,200 g/cm ³ .	53
3.2.5. Ergebnisse und Vergleiche einzelner Wildtyp und Mutanten F Pilusisolationen.	54
3.2.6. Es werden 7 mg Mutanten F Pili von 90 % Reinheit isoliert.	62
3.3. Biochemische Untersuchungen der isolier- ten F Pili.	63
3.3.1. Die Mutanten F Pili haben eine Dichte von 1,200 g/cm ³ .	63
3.3.2. F Pilin hat ein Molekulargewicht von 10750 d.	65
3.3.3. F Pili sind sehr hydrophob und es fehlen Arginin, Histidin und Prolin.	67
3.4. Biologische Untersuchungen an isolierten F Pili.	70
3.4.1. Die Wildtyp und Mutanten F Pili sind kreuzreagierend und enthalten auch F ⁻ spezifische Antikörper.	71
3.4.2. Immunologisch läßt sich nachweisen, daß F Pili an F ⁻ Zellen binden.	72
3.4.3. Auch elektronenmikroskopisch läßt sich nachweisen, daß F Pili an F ⁻ Zellen binden.	75

	Seite
3.4.4. "Männlich spezifische" Bakteriophagen binden an F Pili.	80
<u>4. Diskussion</u>	82
4.1. Die F Pilusisolationismethode.	82
4.2. Biochemische Eigenschaften isolierter F Pili.	85
4.3. Die Bedeutung der biologischen Aktivi- tät der isolierten F Pili.	89
<u>5. Zusammenfassung</u>	94
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	96
<u>7. Appendix</u>	102
7.1. Die F Pilusisolationismethode	102

1. Einleitung

Betrachtet man einzelne Zellen einer Bakterienkultur im Elektronenmikroskop, so lassen sich bei fast allen Spezies filamentartige, extrazelluläre Organellen beobachten. Auf Grund ihrer Länge und ihres Durchmessers fallen dabei zuerst die Geißeln oder Flagellen auf. Sie dienen der Fortbewegung der Zellen (Smith und Koffler, 1971; Berg und Anderson, 1973) und sind bei Escherichia coli so lang (10 μm) und breit (200 Å), daß sie nach Färbung oder im Dunkelfeld sogar im Lichtmikroskop dargestellt werden können (Leifson, 1960; Macnab, 1976). Bei der elektronenmikroskopischen Beobachtung sehen sie meistens sinuskurvenförmig aus.

Alle anderen filamentartigen, extrazellulären Organellen tragen die Bezeichnung "Pili" (Brinton, 1959; Brinton, 1965). Sie sind bis auf wenige Ausnahmen kürzer, dünner und steifer als die Geißeln (Brinton, 1965; Ottow, 1975). Über ihre biologische Funktion kann nur in den seltensten Fällen eine Aussage gemacht werden. Es gibt jedoch eine Reihe von Beobachtungen, die darauf hinweisen, daß einige Pili zur Bindung der Zellen an spezifische Strukturen ihrer Umwelt, wie Erythrocyten oder anderer Eukaryontenzellen, dienen und dadurch einen Einfluß auf die Pathogenität einiger Stämme haben (Kline, 1976).

Eine in dieser Arbeit genauer beschriebene Aufgabe fällt den Sex Pili zu. Unter ihnen versteht man alle Pili, die genetisch von Sex Faktoren determiniert werden (Meynell und Lawn, 1967). Sex Faktoren werden während der von Lederberg und Tatum (1946) entdeckten bakteriellen Konjugation von einer Zelle auf die andere übertragen. Zu ihnen gehören auch die Resistenzfaktoren, die dem Wirtsstamm die Resistenz gegen ein oder mehrere Antibiotika verleihen. Sie sind besonders für die Medizin und Epidemiologie von großer Bedeutung, da auf sie die in letzter Zeit beobachtete starke Zunahme der Ausbreitung antibiotikaresistenter Krankheitserreger zurückzuführen ist.

Der in E. coli am besten untersuchte Sex Faktor jedoch ist F. Stämme, die ihn tragen, werden als F^+ bezeichnet und zeigen im Elektronenmikroskop F Pili (Brinton, 1964; Brinton, 1965). Eine F^+ E. coli Zelle zeigt Abbildung 1. Auf ihr sind Flagellen, Typ I Pili und F Pili zu erkennen. Die Typ I Pili sind kürzer, dünner und steifer als F Pili. Ihre Funktion ist unbekannt.

Im Gegensatz zu den Typ I Pili konnten bei den F und anderen Sex Pili einige biologische Aktivitäten nachgewiesen werden.

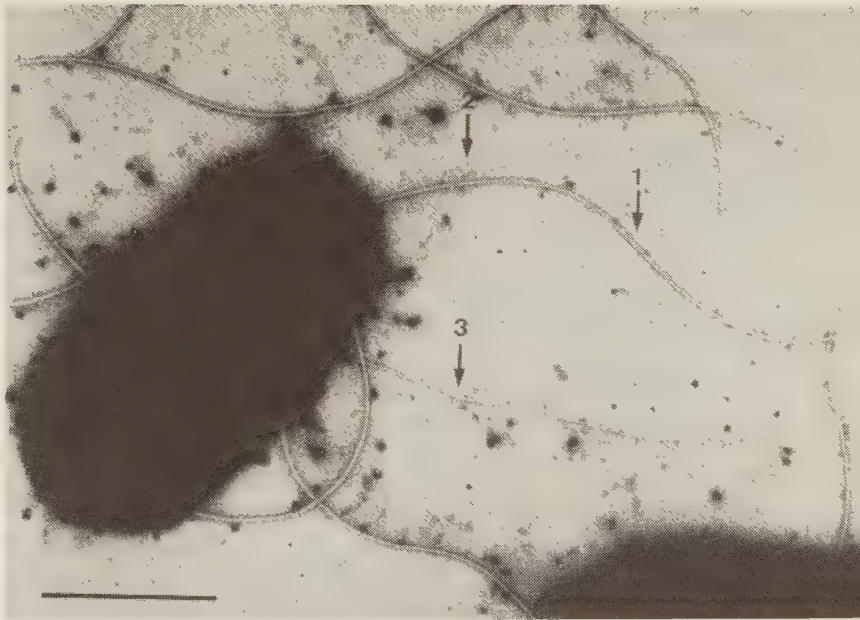


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer F^+ E. coli Zelle. Der Strich repräsentiert bei allen Aufnahmen $1\ \mu\text{m}$, 1 Geißel, 2 Typ I Pilus, 3 F Pilus (Vergrößerung 32.000 x)

Sex Pili stellen die Rezeptoren der sogenannten "männlich spezifischen" Bakteriophagen dar (Valentine und Strand, 1965). Zu diesen Phagen gehören sowohl die filamentartigen DNA (Caro und Schnös, 1966) als auch die spärlichen RNA Phagen (Crawford und Gesteland, 1964). Sie haben gemeinsam, daß ein bestimmter Phage auch nur an bestimmte Sex Pili adsorbieren kann.

Auf Grund dieser Bindungsspezifität konnten alle Sex Pili, die Rezeptor eines bestimmten Phagen sind, in einer Klasse zusammengefaßt werden (Lawn et al., 1967). Zusätzlich ergaben Untersuchungen der antigenen Eigenschaften (Ørskov

und Ørskov, 1960; Harden und Meynell, 1972) der Sex Pili, daß es unter ihnen Gruppen gibt, die eine starke, schwache oder keine immunologische Kreuzreaktion zeigen (Stirns et al., 1966). Auf Grund dieser beiden Kriterien gelang es, Sex Pili in Pilusklassen einzustufen. Diese sind in Tabelle 1 aufgeführt. Es ist zu bemerken, daß die Klasse F vier, und die Klasse I zwei serologische Untergruppen aufweist (Lawn und Meynell, 1970).

Die eigentliche biologische Bedeutung der Sex Pili liegt jedoch in ihrer Wichtigkeit für den Konjugationsprozeß. Diese ließ sich durch Untersuchungen an konjugierenden Zellen und Zellpopulationen nachweisen. Unter anderem wurden dabei folgende Ergebnisse erzielt:

1. Achtman (1975) konnte zeigen, daß eine der ersten Stufen des Konjugationsprozesses darin besteht, Transferierungsaggregate aufzubauen. Diese setzen sich aus vielen Konjugationspartnern zusammen.

Werden nun Mutanten, die keine F Pili tragen, als Donatoren benutzt, lassen sich physikalisch keine Konjugationsaggregate nachweisen. Es findet auch kein genetisch nachweisbarer DNA Transfer statt (Achtman et al., 1971; Achtman, 1976).

Sex Pilus- klasse	Serologische Unterklasse	Plasmid <u>Flac</u>	Spezifischer Phage	Referenz
F	F R1 R538-1 R100	R1 R538-1 R100	MS2, M12, fd	Lawn und Meynell, 1970; Brinton 1971
I	R64 ColI	R64 ColI-P9	If1, If2	Lawn und Meynell, 1970; Meynell et al., 1968
N		N3	IKe	Khatoon et al., 1972
P		RP1	PRR1	Bradley 1974
W		S-a		Bradley und Cohen 1976
E		R401	pile/R1	To et al., 1975

Tabelle 1: Sex Pilusklassen einiger Sex Faktoren

2. Zellen, von denen die F Pili mechanisch abgeschert wurden, verlieren ihre Fertilität und erhalten diese mit der gleichen Kinetik, mit der F Pili neu synthetisiert werden, zurück (Novotny et al., 1969; Brinton, 1971).
3. F Pili sind sehr sensitiv gegen das Detergens Natrium Lauryl Sulfat (SDS). Schon bei einer Konzentration von 0,01 % lassen sich 5 Minuten nach SDS Zugabe keine F Pili mehr nachweisen (Tomoeda et al., 1975). Gleichzeitig verhindert SDS auch den DNA Transfer und den Aufbau der Transferierungsaggregate (Achtman, 1975).
4. Nach Zugabe männlich spezifischer DNA und RNA Phagen zu einem Kreuzgemisch lassen sich weder physikalisch Transferierungsaggregate (Ou, 1973) noch genetisch ein DNA Transfer nachweisen (Novotny et al., 1968). Bei hohen Multiplizitäten der RNA Phagen werden sogar bestehende frühe Stufen der Transferierungsaggregate zerstört (Ou, 1973).
5. Zn^{++} Ionen treten mit dem Pilusende in Wechselwirkung, da sie die Adsorption männlich spezifischer DNA Phagen verhindern. Gleichzeitig inhibieren Zn^{++} Ionen die Konjugation (Ou und Anderson, 1972 a+b).
6. Es konnte gezeigt werden, daß die Konjugation durch Zugabe F Piluspezifischer Antikörper zu F^+ Kulturen inhibiert werden kann (Harden und Meynell, 1972).

Trotz dieser aufgeführten Ergebnisse, die deutlich zeigen, daß der Konjugationsprozess in E. coli an intakte F Pili gebunden ist, liegen bis heute über deren biologische Rolle nur Modelle vor, die auf reiner Spekulation beruhen und durch keine Experimente belegt sind.

Brinton schlug 1965 vor, daß F Pili aus einer hohlen Proteinröhre bestehen, durch die der DNA Transfer stattfindet. 1971 erweiterte er sein Modell dahingehend, daß ein Pilus aus zwei benachbarten Proteinzylindern besteht, die an ihrer Berührungsfläche eine Rille entstehen lassen. Durch diese kann die DNA auf zwei Arten transportiert werden. Es bietet sich erstens eine Art "Förderband" Mechanismus an. Bei ihm wird der eine Proteinzylinder ständig von der Zelle hinweg und der andere zur Zelle hin bewegt. Alternativ dazu kann der Pilus ständig in der Donorzellwand polymerisiert und in der Rezipientenzellwand depolymerisiert werden.

Bei den oben beschriebenen Modellen wird der DNA Transport direkt durch den Pilus hervorgerufen. Ihnen steht ein von Marvin und Hohn (1969) und Curtiss (1969) entwickeltes Modell gegenüber. Bei ihm dient der Pilus nur der Erkennung und Bindung einer F^- Zelle. Er wird dann zurückgezogen und stellt so einen Zellwandkontakt der beteiligten Zellen her. Der eigentliche DNA Transfer findet also nicht durch

den Pilus, sondern durch eine Zellwandbrücke statt.

Auch Brintons Untersuchungen an isolierten F Pili konnten nicht zur Klärung der Frage, welches der beiden Modelle richtig sei, beitragen. Deswegen steht auch bis heute noch eine experimentell bestätigte Analyse der einzelnen Schritte der bakteriellen Konjugation aus.

Um die Funktion der F Pili bei der Konjugation und Phageninfektion untersuchen zu können, wäre es notwendig, biologisch aktive F Pili zu isolieren. Sie würden es erstmalig ermöglichen, einzelne am Konjugationsprozess beteiligte Komponenten zu reinigen und die Reaktionsschritte in vitro zu untersuchen. Zur Isolation solcher biologisch aktiven F Pili gibt es jedoch keine Präparationsmethode. Brintons Methode, F Pili zu isolieren, ist nie veröffentlicht worden. Lediglich Beard (1972) hat eine Methode, Sex Pili des R Faktors R1drd19 zu isolieren, publiziert. Sie weist jedoch zwei Nachteile auf, die sie für die Isolation biologisch aktiver F Pili ungeeignet erscheinen läßt. Erstens konnte bis jetzt niemand zeigen, daß sie auch auf F Pili anwendbar ist, und zweitens verwendet sie denaturierende Reinigungsschritte, die bei der Isolation biologisch aktiver Strukturen vermieden werden sollen.

Um die Voraussetzungen für Versuche über die biochemischen Prozesse der Zellwechselwirkungen während früher Stufen der Konjugation zu schaffen, beschreibt die vorliegende Arbeit die Entwicklung einer Methode zur Isolation biologisch aktiver F Pili und deren biochemische und biologische Charakterisierung.

2. Material und Methoden

2.1. Abkürzungen

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure
SDS	Natriumlaurylsulfat
PWS	Wolframatophosphorsäure
TMED	N,N,N',N' Tetramethyläthylendiamin
PEG	Polyäthylenglycol 6000
pfu	Plaque bildende Einheiten
WT	Wildtyp)
	) in bezug auf den F Pilus
Mut	Mutante)
d	Dalton
<u>E.</u>	<u>Escherichia</u>

2.2. Medien, Platten, Chemikalien

Die flüssigen und festen Medien sind von Achtman (1975) beschrieben worden und sind hier kurz in ihrer chemischen Zusammensetzung wiederholt. Generell wurden Puffer und Agar vor der Zugabe der Aminosäuren und anderer Zusätze autoklaviert. Aminosäuren, Zuckerlösungen und Antibiotika wurden durch Filtration oder Autoklavierung sterilisiert.

2.2.1. Flüssige Methoden

L Broth: L Broth ist ein Vollmedium und wurde zum unselektiven Wachstum der Bakterien benutzt.

1 l Aqua bidest; 10 g Difco Bacto-Tryptons; 5 g Difco Yeast Extrakt; 10 g NaCl; 2 Plätzchen NaOH

L Thy Broth: L Broth mit einer Thymin Konzentration von 40 µg/ml.

E Broth: 1 l Aqua bidest; 2 g Pepton; 10 g Difco Yeast Extrakt; 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 15 ml Glycerin; 5 g Na-Glutaminat (Edelbluth, persönliche Mitteilung).

R Broth: 1 l Aqua bidest; 1,2 g Tri NH_4 Citrat; 2,4 g NaCl; 15 g Difco Yeast Extrakt; 0,85 g Na_2HPO_4 anhyd; 0,62 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Nach dem Autoklavieren: 12 ml Glycerin; 2,5 ml 2 M K_2HPO_4 ; 1 ml 1 M CaCl_2 ; 1 ml 1 M Eisen III Citrat (Thompson, persönliche Mitteilung).

Medium 56: Medium 56 ist der Ausgangspuffer für alle Minimalmedien.

550,8 ml 0,1 M Na_2HPO_4 ; 350,1 ml 0,1 M KH_2PO_4 ; 18 ml 10 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,8 ml 10 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,9 ml 1,44 % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0,9 ml 0,05 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

Um flüssige Minimalmedien herzustellen, wurde Medium 56 1 : 1 mit Aqua bidest versetzt (Medium 56/2) und entsprechende Aminosäuren zugesetzt.

D Medium: Alle Verdünnungen wurden in D Medium ausgeführt. D Medium ist eine Mischung von L Broth und 56/2 im Verhältnis 1 : 1.

2.2.2. Feste Medien

Generell wurden 25 ml pro Platte eingefüllt.

L Platten: L Platten bestehen aus L Broth, dem 2 % Agar zugesetzt sind. Sie wurden zum routinemäßigen Wachstum der Bakterien auf nicht selektiven Platten benutzt.

EMB Platten: Auf EMB (Eosin gelb, Methylenblau) Zucker Platten werden Kolonien, die den im Medium enthaltenen Zucker verwerten können, rot gefärbt, während Kolonien, die die Kohlenstoffquelle nicht fermentieren können, weiß aussehen.

1 l Aqua bidest; 10 g Difco Bacto-Tryptone; 1 g Difco Yeast Extrakt; 5 g NaCl; 2 g KH_2PO_4 ; 20 g Agar.

Nach dem Autoklavieren wurde der gewünschte Zucker und 10 ml 4 % Eosin gelb und 10 ml 0,65 % Methylenblau zugesetzt.

Minimal Agar Platten: Zu Medium 56 wurden die gewünschten Aminosäuren und Antibiotika gegeben und die Lösung 1 : 1 mit geschmolzenem 4 % Agar vermischt.

2.2.3. Chemikalien

Cäsiumchlorid	Merck
Acrylamid	Serva
N-N'Methylen Bis Acrylamid	Serva
TMED	Serva
Ammoniumpersulfat	Merck
Tris-Base	Merck pro analysi
EDTA	Merck
Natriumlaurylsulfat	Serva
Sucrose	Schwarz/Mann RNase-frei
Wolframatophosphorsäure	Merck
Coomassie brilliant blau R250	Serva
Bromophenolblau	Merck
Polyethylenglycol 6000	Merck

2.3. Genetische Methoden

2.3.1. Bakterienstämme

Da in dieser Arbeit im wesentlichen nur zwei Stämme benutzt wurden, sollen diese nicht mit ihrer Stammmummer bezeichnet werden, sondern die Bezeichnung Wildtyp (WT)

und Mutante (Mut) tragen. Der mit Wildtyp bezeichnete Stamm trägt die Nummer M1380 und den Sex Faktor JCFLO (Achtman et al., 1971) in dem Wirtsstamm M1379. In Bezug auf die F Pili zeigt dieser Stamm den Wildtyp Phänotyp.

Der mit Mutante bezeichnete Stamm trägt die Nummer M1381 und den Sex Faktor MPFL57 in dem gleichen Wirtsstamm M1379. In Bezug auf die F Pilusproduktion zeigt er den Mutanten Phänotyp.

Der Wirtsstamm M1379 ist auf Grund der Mutation flaP871 geißellos. Er ist ein Derivat des von Silverman und Simon 1973 beschriebenen Stammes MS1350 und wurde von Dr. Julius Adler zur Verfügung gestellt. Der Stamm JE2217 ist Fla^- und Pil^- und wurde von Dr. E. Ohtsubo isoliert (Ishibashi, 1966; Iyobe et al., 1973).

Zur Übertragung eines Sex Faktors auf einen neuen Wirtsstamm wurden 0,1 ml der über Nacht inkubierten Donorkultur mit 0,1 ml der über Nacht inkubierten Rezipientenkultur vermischt. Nach anschließender Zugabe von 1,8 ml L Broth wurde das Kreuzungsgemisch für 2 h bei 37° stehend inkubiert. Im Falle des geißellosen Rezipienten (M1379) wurden die entstandenen F^+ Zellen durch einen Test auf Sensitivität gegen den Phagen M12 identifiziert. Plasmidchimeren tragende Flac Stämme konnten auf Grund ihres Tetracyclin resistenten, Lactose-verwertenden Phänotyps selektioniert werden.

2.3.2. Bakteriophagen

Generell wurden in der vorliegenden Arbeit nur Lysate der "männlich spezifischen" Bakteriophagen verwendet.

M12: Lysate des RNA-Phagen M12 wurden nach der von Achtman et al. (1971) beschriebenen Methode hergestellt. Sie wurden hauptsächlich zur Identifikation des F^+ Charakters nach einer Kreuzung des Flac Sex Faktors in einem Lactose verwertenden Rezipienten benutzt.

MS2: Ein gereinigtes, hochtitriges Lysat des RNA Phagen MS2 von $1,5 \times 10^{15}$ pfu wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Bieberich (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Es diente zum Test der isolierten F Pili auf ihre Phagenbindungsfähigkeit.

2.3.3. Wachstumsbedingungen

Alle im weiteren beschriebenen Kulturen wuchsen bei 37° und wurden heftig belüftet. Zur Beimpfung eines bestimmten Mediums wurde eine stehend in dem entsprechenden Medium über Nacht gewachsene Kultur zwanzigfach verdünnt. Die Wachstumsbedingungen der Stämme zur F Pili-Isolation sind gesondert im Appendix beschrieben.

2.3.4. Zelltiterbestimmungen

Die Wachstumskurven (Titer einer Kultur in Abhängigkeit von der Zeit) wurden durch Zelltiterbestimmungen, in 30 bis 60 Minutenabständen, mit Hilfe eines Coulter Counters (Achtman, 1975) bestimmt.

2.4. Biochemische Methoden

2.4.1. Puffer und Lösungen

a) für die Gelelektrophorese

Gelpuffer: 7,8 g $\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 25,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$; 2 g SDS; auffüllen auf 1 l mit Aqua bidest.

Bis Acrylamid: 22,2 g Acrylamid; 0,6 g Bis Acrylamid; auffüllen auf 100 ml mit Aqua bidest und filtrieren.

Elektrophorese Puffer: Gelpuffer 1 : 1 mit Aqua bidest verdünnt.

Denaturierungspuffer: 1 g SDS; 10 g Glycerin; 1 g Mercapto-ethanol; 1,8 ml einer 1 M NaH_2PO_4 Lösung, 300 µg Bromo-phenolblau, auffüllen auf 100 ml mit Aqua bidest.

Ammoniumpersulfat: 0,15 g auf 10 ml Aqua bidest, Lösung frisch vor Benutzung ansetzen.

b) für die F Pilusisolation

Tris-EDTA: 0,1 M Trishydrochl.; 0,5 mM EDTA pH 7,8

pH einstellen mit HCl

30 % (w/v) Sucrose in Tris-EDTA

80 % (w/v) Sucrose in Tris-EDTA

c) für die Elektronenmikroskopie

2 % Wolframatophosphorsäure in Aqua bidest, pH 5, 6, 7, 8
mit NaOH einstellen

2.4.2. Präparation der Dialyseschläuche

Alle verwendeten Dialyseschläuche wurden dreimal in 10 mM EDTA und 10 mM NaHCO_3 gekocht, um die Schläuche von allen Verunreinigungen zu reinigen. Die Schläuche wurden anschließend in 10 mM EDTA gelagert.

2.4.3. Caesiumchlorid Dichtegradienten

Im Verlauf der Isolation und Charakterisierung der F Pili wurden die folgenden fünf Typen von diskontinuierlichen CsCl Dichtegradienten benutzt.

Typ des Gradienten	Volumen des Zentrifugen- röhrchens	Menge der pro Gradient einzufüllenden CsCl Lösung (Konzentration CsCl)						CsCl ge- löst in
		22%	31%	38%	42%	45%	51%	
1	250		50	50		50	50	Tris-EDTA
2	38,5		10	7		5	5	Tris-EDTA
3	38,5		10	10		10		Tris-EDTA
4	38,5		12	13	5			Aqua bidest
5	38,5		12	12		12		Tris-EDTA

Tabelle 2: Schematische Darstellung der verwendeten Dichtegradiententypen. Alle Angaben in Millilitern.

2.4.4. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Proteinverteilung verschiedenster Proteinpräparate wurde die SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendet. Dabei wurden zwei Typen von Gelen benutzt. Beide sind Modifikationen des von Weber und Osborn (1969) beschriebenen Gelsystems.

Im allgemeinen wurden alle Proteinproben in 100 µl Denaturierungspuffer aufgenommen oder mit einer ausreichenden Menge von 3fach konzentriertem Denaturierungspuffer versetzt. Danach wurde die Probe für 2 min auf 100° im Wasserbad erhitzt.

a) Disk-Gelelektrophorese

Zur Herstellung von 12 10%igen Gelen in 0,6 cm starken Glasröhrchen von 12,5 cm Länge wurden 15 ml Gelpuffer, 13,5 ml Bis-Acrylamid Lösung, 1,5 ml frischer Ammoniumpersulfat Lösung und 45 μ l TMED in einer 100 ml Saugflasche vermischt. Danach wurde unter Wasserstrahlpumpenvakuum entlüftet und die Röhrchen auf 10 cm Länge gefüllt. Anschließend wurde mit einer 0,1%igen SDS Lösung in Aqua bidest überschichtet. Nach der Polymerisation der Gele wurde der Elektrophoresepuffer in die Kammern gefüllt und die Proben mit einer Pasteurpipette aufgetragen.

Die Dauer der Gelelektrophorese betrug ca. 6 h bei einer Stromstärke von 8 mA/Gel. Hatte das Bromophenolblau das Ende der Gele erreicht, wurden diese mit einer 50 ml Spritze aus den Glasröhrchen herausgedrückt und anschließend gefärbt.

b) Plattengele

Da für alle Spuren eines Plattengels die gleichen Bedingungen herrschen, erlaubt es einen wesentlich besseren Vergleich verschiedener Proben. Außerdem bietet es den Vorteil, auch Gele mit einer höheren Acrylamidkonzentration als 10 % herzustellen.

Für ein 12%iges Plattengel wurden 41 ml Gelpuffer, 54 ml Bis Acrylamid Lösung, 5 ml Ammoniumpersulfat Lösung und 150 µl TMED vermischt. Nach der Entlüftung der Lösung wurde diese in eine 4 mm starke Gelkammer gefüllt. War die Polymerisation dieses Trenngels beendet, wurde darauf ein 10,5%iges Probengel aufgegossen. Dieses enthielt 10 ml Gelpuffer, 11 ml Bis Acrylamid Lösung, 35 µl TMED und 2 ml Ammoniumpersulfat Lösung. Die Elektrophorese lief für 16 h bei 30 V.

2.4.5. Proteinfärbung der Gele

Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Dieses wurde zu 1 % in einer Lösung aus 45 % Methanol und 7 % Eisessig gelöst. Die Inkubationsdauer der Gele in dieser Lösung betrug mindestens 2 h bei Zimmertemperatur. Danach wurde der nicht an Protein gebundene Farbstoff in 20 % Methanol und 7 % Eisessig entfernt.

2.4.6. Dichteanalyse

Zur Bestimmung der Dichte der Wildtyp F Pili wurden ca. 150 - 500 µg F Pili in einer Eppendorf Tischzentrifuge für 2 min zentrifugiert und 6 h lang in 80%iger Sucrose, durch heftiges Schütteln, resuspendiert. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen mit Tris-EDTA ausgewaschen und das so gewonnene Material auf einen CsCl Stufengradienten des

Typs IV oder V geladen. Die Zentrifugation dauerte 20 h bei 22.000 rpm und 15° in einem SW27 Rotor. Daraufhin wurde der Gradient durch Austropfen fraktioniert. Von den erhaltenen Fraktionen wurde anschließend die Absorption bei 280 nm zur Bestimmung des Proteingehalts und der Refraktationsindex zur Bestimmung der Dichte gemessen.

Da die Dichte der Gradienten mit einem Refraktometer bestimmt wurde, mußte den ermittelten Werten aller Gradienten, bei denen das CsCl in Tris-EDTA gelöst war, der empirisch ermittelte Wert 0,027 g/cm³ abgezogen werden.

2.4.7. Aminosäureanalyse

Zur Aminosäureanalyse wurden F Pili des Endpräparates noch einmal in einem CsCl Dichtegradienten gereinigt und die Banden anschließend für 3 x 12 h gegen 1 l Aqua bidest dialysiert.

Davon wurden 200 µg (entsprechend 18 nmol F Pilin) lyophilisiert und in 0,2 ml 5,7 N HCl mit 0,02 % Mercaptoethanol gegeben. Nachdem ausgiebig mit Stickstoff gespült worden war, wurde unter Wasserstrahlpumpenvakuum abgeschmolzen und während 20 h bei 110° hydrolysiert. Danach wurde im Exsikkator über Nacht mit NaOH getrocknet und die Probe auf den Aminosäureanalysator gegeben. Dazu wurde ein Gerät von Durrum benutzt (Durrum D500, Durum

Instrument Corporation, Palo Alto, USA). Das Gerät arbeitet im Einsäulenverfahren mit stufenweiser Elution durch drei Puffer (Moore und Stein, 1963).

2.5 Elektronenmikroskopie

Zur Herstellung eines elektronenmikroskopischen Präparates wurde etwas Flüssigkeit der Probe mit einer Drahtöse aufgenommen. Diese hat etwa den Durchmesser eines Kupfernetzes und ihre Verwendung erlaubt ein weitgehend quantitatives Arbeiten. Daraufhin wurde die Öse auf ein Formvar-Kohle oder Kohle beschichtetes Kupfernetz (300 mesh) gedrückt. Dieses lag auf Filterpapier, das den Flüssigkeitsfilm der Öse gleichmäßig nach allen Seiten abzog. Anschließend wurde zweimal durch Auflegen des Netzes auf einen Tropfen Aqua bidest, gewaschen und das Präparat mit 2 % PWS negativ kontrastiert.

Die erhaltenen Präparate wurden dann in einem Siemens Elmiskop Ia elektronenmikroskopisch ausgewertet.

2.6. Bestimmung des F Pilusgehaltes einer Probe

2.6.1. Elektronenmikroskopisch

Mit Hilfe der hier verwendeten elektronenmikroskopischen Methode lassen sich nur die relativen Mengen der zellge-

bundenen F Pili zweier Proben vergleichen. Über die absoluten Mengen an F Pili können jedoch keine Aussagen gemacht werden, da keine Relation zwischen der Zahl der F Pili und der Proteinmenge bekannt ist.

Außerdem ist ein Vergleich der frei im Medium vorliegenden F Pili zweier Proben mit der hier verwendeten Methode nicht möglich, da die Adsorptionshäufigkeiten der freien Pili an die Trägernetze zu großen Schwankungen unterliegen.

Zur quantitativen Bestimmung der F Pili pro Zelle einer Probe wurden zwei Methoden angewandt, die, wie Kontroll-experimente ergaben, zu gleichen Resultaten führten.

a) Der Testkultur wurde eine 0,5 ml große Probe entnommen und diese auf Eis gestellt. Sofort danach wurde ein Teil der Probe auf ein Objektträgernetz gebracht und dieses für die Elektronenmikroskopie negativ kontrastiert. Diese Methode wurde besonders zur Auswertung der Versuche zur Bindungsfähigkeit isolierter F Pili an F^- Zellen verwendet.

b) Zu 1 ml der Testkultur wurde 0,08 ml 35%iges Formaldehyd und 0,1 ml eines ca. 10^{11} pfu M12 Lysates gegeben. Anschließend wurden die so fixierten Zellen über Nacht bei 4° inkubiert. Während dieser Zeit sinkt der größte Teil der Zellen zum Röhrchenboden und es findet eine sehr effiziente Bindung der Phagen an die Pili statt. Daraufhin wurden ca. 0,8 ml

der Flüssigkeit über dem Zellsediment verworfen und die Zellen durch leichtes Schütteln mit der Hand aufgewirbelt. Durch diese Behandlung fand eine ca. 10-fache Konzentration der Zellen statt.

Diese Methode wurde hauptsächlich dann angewendet, wenn es darum ging, sehr viele Proben oder Proben mit einem niedrigeren Zelltitel auszuwerten. Sie hat den Vorteil, daß sehr viele Zellen auf das Netz gelangen und die Pili durch die adsorbierten Phagen sehr einfach von anderen Zellorganellen zu unterscheiden sind.

Zur Auswertung der durch beide Methoden gewonnenen Netze wurden alle Pili gut negativ kontrastierter Zellen einer Netzmasche gezählt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, daß eine eindeutige Zuordnung zwischen dem Pilus und einer Zelle bestand. Zellklumpen, Piluskristalle und Zellen, die am Rand einer Netzmasche lagen, wurden nicht berücksichtigt. Deswegen stellen alle im Verlauf dieser Arbeit in bezug auf die F Pili angegebenen Zahlen jeweils einen Minimalwert dar.

2.6.2. Gelelektrophoretisch

Im Gegensatz zur oben beschriebenen elektronenoptischen Methode ist die gelelektrophoretische Bestimmung der Menge des F Pilins quantitativ. Die angewandte Methode läßt sich

jedoch nicht auf ganze Zellkulturen anwenden, da bei ihnen der Proteinhintergrund viel zu hoch ist.

Die Menge und Homogenität eines F Pilus Präparates in einzelnen Reinigungsstufen konnte jedoch mit Hilfe der SDS Polyacrylamide Gelelektrophorese bestimmt werden. Dazu wurden jeweils 5 µg Hühnereiweiß Serumalbumin als Standard benutzt. Das Protein ergibt nach der Färbung mit Coomassie Brilliant Blau eine Bande, deren Absorbtion bei 600 nm mit einem Gilford Gelscanner aufgezeichnet werden kann. Die dabei aufgezeichnete Fläche unter der Absorptionskurve an der Position der betreffenden Proteinbande stellt ein Maß für jeweils 5 µg Protein dar.

Eine ermittelte Standardkurve zeigte, daß unter den gewählten Bedingungen nur in dem Bereich unter 10 µg Protein ein linearer Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Färbung besteht. Deswegen wurden für alle Proteinmengenbestimmungen nur Gele zugrunde gelegt, bei denen die untersuchte Bande nicht mehr als 10 µg Protein enthielt. Im Zweifelsfall wurde für das F Pilin der Minimalwert und für kontaminierende Proteine der Maximalwert angegeben.

2.7. Immunologische Methoden

2.7.1. Antiserumgewinnung

Zur Immunisierung gegen F Pili wurde den Tieren in Abständen von 10 Tagen 6 mal 500 μg F Pili mit complete (ersten 4 Injektionen) und incomplete Freund's-Adjuvant (letzten 2 Injektionen) subcutan, multiloculär injiziert. Die Abnahme von ca. 20 ml Kaninchen- und 300 ml Schafserum erfolgte am 70. Tag nach der ersten Injektion.

2.7.2. Isolation F Pilusspezifischer Antikörper

Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich, daß Antiserum gegen F Pili, so wie sie aus dem Tier gewonnen werden, die F^+ Zellen vollkommen und F^- Zellen teilweise präzipitieren. Da die gewonnenen Antikörperpräparate jedoch zum Test der isolierten F Pili an F^- Zellen herangezogen werden sollen, stellt man an sie die Anforderung, F^- Zellen überhaupt nicht zu agglutinieren. Deswegen wurden die F Pilusspezifischen Antikörper des Serums isoliert. 150 μg F Pili wurden für 2 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert und in 150 μl 80%iger Sucrose resuspendiert. Die gelösten Pili wurden daraufhin zu 10 ml Tris-EDTA gegeben und langsam durch einen 0,22 μm Falcon Filter gesogen. In dem durchgelaufenen Material ließen sich danach elektronenoptisch keine F Pili nachweisen. Anschließend passierte das

Serum den Filter ohne Sogwirkung durch Inkubation für 12 h. Danach wurde der Filter mit je 20 ml Saline von allen Antikörpern, die nicht spezifisch an die Pili gebunden hatten, gewaschen. Die an Pili gebundenen Antikörper hingegen konnten nur mit je 25 ml 0,5 M Glycin-HCl, pH 2,5 Puffer abgewaschen werden. Dazu wurde der Puffer langsam in ein mit 40 ml 1 M K_2HPO_4 Puffer gefülltes Gefäß gesogen. Nach Extraktion F Pilus spezifischer Antikörper betrug der pH der Lösung 7,5. Das so gewonnene Material wurde anschließend gegen 0,85 % NaCl dialysiert.

2.8. Biologische Tests isolierter F Pili

2.8.1. Test auf Bindung an F^- Zellen

Die Bindung der isolierten F Pili an F^- Zellen kann sowohl immunologisch als auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

Für den immunologischen Nachweis wurden bei einer Reihe von Versuchen 2 μg - 3,5 μg F Pili in 80 % Sucrose gelöst und zu F^- Zellen gegeben. Diese waren auf einen Titer von 2×10^7 Zellen/ml verdünnt und wuchsen dann in Gegenwart der F Pili bis zur frühen stationären Phase. Danach wurde die Kultur, entweder in Microtiterplatten (Greiner) oder Röhrchen, mit verschiedenen Verdünnungen des Antiserums vermischt und für 60 min bei 37° inkubiert. Als Kontrollen

wurde zu reinen F^- Zellen das entsprechende Antiserum und zu F^- Zellen, zu denen Pili gegeben waren, anstelle des Serums, die gleiche Menge Saline gegeben. Nach der Inkubation wurde die Kultur mit dem bloßen Auge und dem Lichtmikroskop auf Agglutination getestet.

Um die Bindung der isolierten F Pili an F^- Zellen elektromikroskopisch nachzuweisen, wurden zwischen $1\text{ }\mu\text{g}$ und $10\text{ }\mu\text{g}$ F Pili zu 2 ml der F^- Zellen verschiedener Stämme gegeben. Auch hier wurden die F^- Zellen bis zu einem Titer von 10^7 Zellen/ml verdünnt. Danach wurde bis zum Erreichen der stationären Phase (ca. 180 min) bei 37° inkubiert. Bei F Piluzugaben zwischen $5\text{ }\mu\text{g}$ - $10\text{ }\mu\text{g}$ konnten die an die F^- gebundenen F Pili nicht sofort gezählt werden, da der Hintergrund ungebundener F Pili zu groß war. Deswegen wurden die Kulturen durch ein- bis zweimalige Zentrifugation und Resuspension gewaschen. In Fällen einer F Piluzugabe zwischen $1\text{ }\mu\text{g}$ - $3\text{ }\mu\text{g}$ konnte auf das Waschen verzichtet werden.

2.8.2. Test auf Bindung "männlich spezifischer"

Bakteriophagen

$3,5\text{ }\mu\text{g}$ der Wildtyp und Mutanten F Pili wurden zu 1 ml L Broth, das $2,5\text{ mM CaCl}_2$ und $0,1\text{ \% MgSO}_4$ enthielt, gegeben. Zu dieser Lösung wurden nach leichtem Schütteln mit der Hand ca. 4×10^{12} pfu eines gereinigten MS2 Phagenlysates gegeben. Daraufhin wurde für 30 min bei 37°

und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden von dem Gemisch Netze für die Elektronenmikroskopie angefertigt.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1. Versuche zur Vermehrung der F Pilusausgangsmenge

Da es bei der Entwicklung der F Pilusisolationmethode darauf ankam, eine möglichst hohe F Pilusausgangsmenge mit einem minimalen Gehalt an kontaminierenden Proteinen zur Verfügung zu haben, wurden Versuche zur Erhöhung des F Pilusgehaltes einer Kultur durchgeführt.

3.1.1. Die meisten F Pili werden am Beginn der stationären Wachstumsphase produziert und geißellose sind geißeltragenden Wirtsstämmen vorzuziehen.

Abbildung 2a zeigt die F Pili pro Zelle und Abbildung 2b die Pili pro Milliliter in Abhängigkeit vom Titer einer Wildtyp E. coli Kultur. Dieser Versuchstyp wurde viermal durchgeführt und zeigt stets zwei Gipfelpunkte der F Pilusproduktion. Einen kurz nach dem Anfang der exponentiellen Wachstumsphase und einen am Übergang der exponentiellen zur stationären Phase. Nach dem Erreichen der stationären Phase sinkt die Zahl der Pili pro Zelle, in der für den Versuch benutzten gut durchlüfteten Kultur, auf ca. 0,5. Dieser Abfall der zellgebundenen F Pili innerhalb einer sehr kurzen Zeit ist charakteristisch für den Wildtyp E. coli Stamm. Dieser hat als Ursprungstamm zur Isolation von F Pili jedoch den Nachteil, zum Zeitpunkt des höchsten

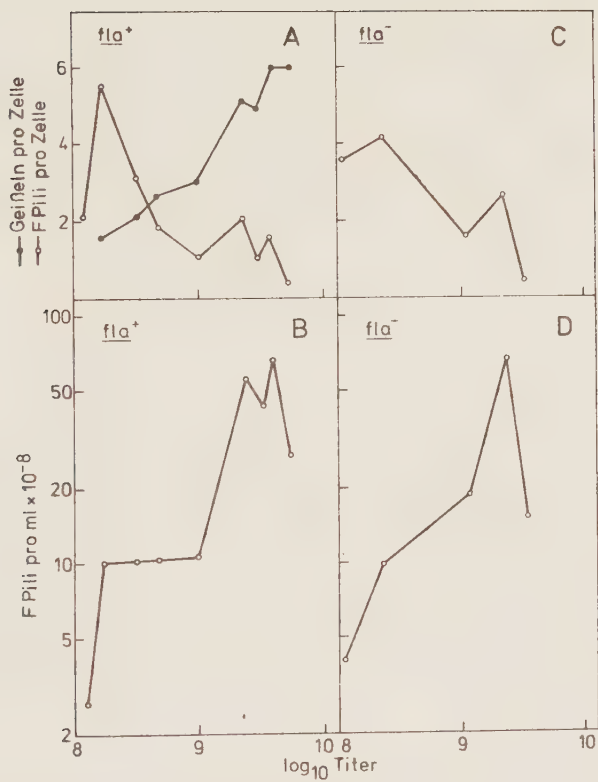


Abbildung 2: Gehalt zellgebundener F Pili und Geißeln eines begeißelten (fla^+) und geißellosen (fla^-) *E. coli* Stammes.

Pilustiters auch sehr viele Flagellen zu besitzen (siehe Abbildung 2a). Beard et al. (1972) konnten zeigen, daß diese nur unter großen Verlusten an R Pili von diesen zu trennen sind. Ähnliches war auch für F Pili zu erwarten und bestätigte sich auch im Verlauf dieser Arbeit (Ergebnisse dazu werden nicht gezeigt). Deswegen wurden alle weiteren Versuche in einem neuen Wirtsstamm, der keine Flagellen synthetisieren kann (fla⁻), durchgeführt. Die für ihn ermittelten Werte zeigt Abbildung 2c,d.

Es ist festzustellen, daß sich die gefundenen Werte gleichen und kein negativer Einfluß der Mutation, die zum Verlust der Geißeln führt, auf die F Pilussynthese ausgeht. Deswegen wurden zur Isolation der F Pili nur geißellose Stämme benutzt.

3.1.2. Isolation einer Flac Mutante mit höherer F Pilusausgangsmenge

Für einen Ausgangsstamm zur F Pilus Reinigung wäre es vorteilhaft, auch bei hohen Zelltitern und für Zeiträume, die genügend experimentellen Spielraum lassen, möglichst viele zellgebundene F Pili zu besitzen. Dazu müßte der Wildtyp Flac Faktor so mutiert werden, daß während aller Wachstumsphasen mehr Pili als beim Wildtyp produziert werden und der charakteristische Abfall der Piluszahl nach dem Erreichen der stationären Phase nicht auftritt.

Zur Isolation solch einer Mutante wurde von der Beobachtung ausgegangen, daß Stämme, die einen dereprimierten R Faktor tragen, eine höhere Anzahl an R Pili pro Zelle aufweisen. Außerdem sind stationär wachsende R^+ Kulturen äußerst verklumpt (Lawn und Meynell, 1970). Deswegen liegt die Überlegung nahe, daß eine Pilus-überproduzierende Flac Mutante an ihrer starken Selbstaggregation erkannt werden kann.

Solche selbstaggregierenden E. coli Stämme sind bei der Suche nach Mutanten, die ihre "schlechte Rezipientenfähigkeit" (Surface exclusion) verloren hatten, von Achtman (persönliche Mitteilung) isoliert worden. Ihre Isolation erfolgte nach Ethyl Methan Sulfonat Mutagenese und der Anreicherung von Bakterienaggregaten auf einem Sucrosegradienten nach Kreuzung der mutagenisierten Kultur mit einem Hfr. Es stellte sich jedoch heraus, daß keine der isolierten Mutanten ein guter Rezipient und dadurch Surface Exclusion defizient geworden war.

Die 15 isolierten Klone wurden jedoch im Elektronenmikroskop auf ihre F Pilusproduktion hin untersucht. Dabei zeigten drei eine F Piluszahl, die auch in der stationären Phase über 1 Pilus pro Zelle lag. Die Mutante MPFL57 hatte den höchsten Wert von 1,7 Pili pro Zelle.

3.1.3. Auch das Wachstumsmedium hat einen Einfluß auf die F Pilusmenge.

Ein weiterer Anstieg der Menge des F Pilins könnte durch Verwendung eines Wachstumsmediums erreicht werden, das entweder die Zahl der F Pili pro Zelle erhöht oder bei gleicher F Piluszahl sehr hohe Zelltitert erlaubt. Um das festzustellen, wurden der Wildtyp und die Mutante in drei Medien hochgewachsen und Proben zur Bestimmung der F Pili pro ml zu bestimmten Zeiten genommen.

Für das verwendete R Medium konnte empirisch gezeigt werden, daß es sehr hohe Zelltitert ermöglicht (Thompson, persönliche Mitteilung). Das E Medium hingegen ist stark Phosphat gepuffert und hält deswegen auch bei hohen Zelltitern den pH Wert konstant (Edelbluth, persönliche Mitteilung).

Es zeigt sich, daß in L Thy Broth zwar nicht die höchsten Zelltitert erreicht wurden, die F Piluszahlen jedoch doppelt so hoch liegen wie bei den anderen Medien. Zusätzlich wurden Versuche angestellt, den Titer einer L Thy Broth Kultur durch Glucosezugabe zu erhöhen. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine Glucosezugabe nach Erreichen der stationären Phase tatsächlich wieder zum erneuten exponentiellen Wachstum führt und die Zahl der F Pili pro Zelle vor und nach Glucosezugabe nahezu unverändert bleibt.

3.1.4. Die Mutante trägt doppelt so viele zellgebundene F Pili und verliert sie nicht in der stationären Wachstumsphase.

Einen Vergleich der F Pilussynthese zwischen Wildtyp und Mutanten Flac Faktor in dem fla⁻ Wirtsstamm zeigt Abbildung 3. Dabei sind die F Pili pro Zelle in Abhängigkeit

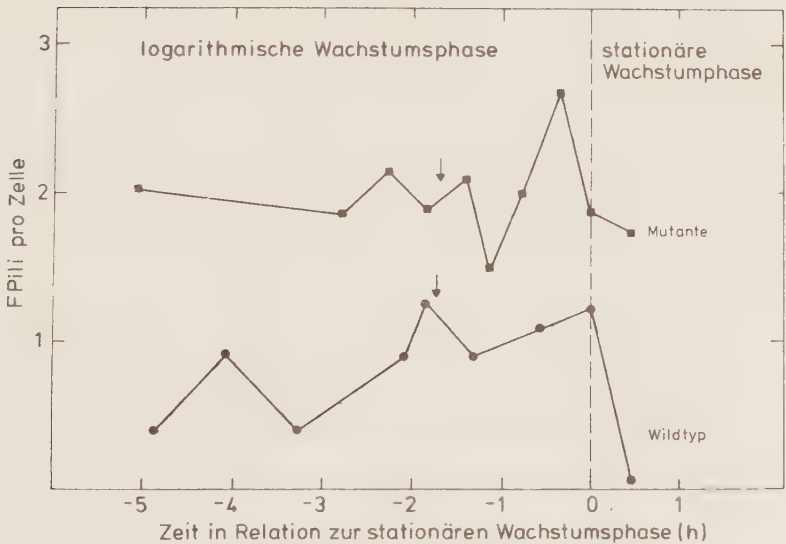


Abbildung 3: Vergleich zwischen den F Pili pro Zelle des Wildtyp und Mutanten F Faktors.

von der Zeit, die benötigt wird, ehe die Kultur die stationäre Phase erreicht, aufgetragen. Diese Darstellung

wurde gewählt, da sie besonders gut das unterschiedliche Verhalten von Wildtyp und Mutante deutlich macht. Außerdem wurde dieser Versuch in einer großvolumigen 2 l Kultur durchgeführt, damit die gewählten Bedingungen denen einer F Pilusisolation gleichkommen. Es ist zu sehen, daß der Wildtyp nur an zwei Punkten der Kurve mehr als einen Pilus pro Zelle besitzt. Diese Punkte liegen jeweils beim Erreichen der stationären Wachstumsphase. Das tritt zum ersten Mal zum Zeitpunkt von ca. 80 min auf, zu dem, wie bereits vorher beschrieben, Glucose zur Kultur gegeben wird, um den Titer noch weiter zu erhöhen. Wie man sieht, hat diese Zugabe den Erfolg, daß die Zahl der Pili pro Zelle nach einiger Zeit wieder ansteigt. Beim Erreichen der stationären Phase fällt die Zahl der Pili pro Zelle jedoch drastisch auf 0,06 Pili pro Zelle.

Anders verhält sich die Mutante. Bei ihr liegt die Zahl der Pili pro Zelle während der gesamten Zeit mindestens doppelt so hoch wie die des Wildtyps. Dieses Verhalten zeigt sich nur in Kulturen, die ein großes Volumen haben.

Der Hauptunterschied zwischen beiden Stämmen zeigt sich jedoch beim Erreichen der stationären Phase. Während beim Wildtyp ein drastischer Abfall der Zahl der Pili pro Zelle festzustellen ist, ist dieser bei der Mutante kaum ausgeprägt.

Der Einfluß des Mutantenphänotyps auf die isolierbare Menge der zellgebundenen F Pili läßt sich wesentlich deutlicher in Abbildung 4 ablesen. Hier ist zu sehen,

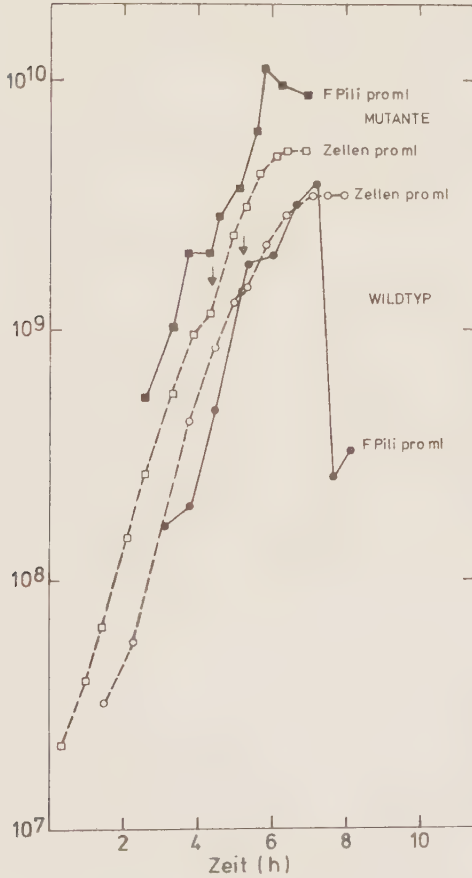


Abbildung 4: Wachstumskurven und F Pili pro ml einer Wildtyp- und Mutantenkultur.

daß bei der Wildtypkultur nur für einen relativ kurzen Zeitraum ein Pilustiter von $3,7 \times 10^9$ Pili pro ml erreicht wird. Der Höchstwert des Pilustiters von $1,15 \times 10^{10}$ Pili pro ml der Mutante besteht zwar auch nur für einen kurzen Zeitraum, jedoch sinkt er innerhalb einer Stunde nur auf $8,8 \times 10^9$ Pili pro ml. Der F Pilustiter des Wildtyp fällt hingegen nach Erreichen der stationären Phase innerhalb von 20 min auf $2,5 \times 10^8$ Pili pro ml.

3.1.5. Die Mutation kartiert im tra Operon.

Die isolierte Flac Mutante MPFL57 unterscheidet sich in zwei Eigenschaften vom Wildtyp FlacFaktor JCFLO:

1. Sie trägt beim Wachstum in großen Kulturen mehr Pili pro Zelle als der Wildtyp (siehe Abbildung 3).
2. Sie hat nicht wie der Wildtyp die Eigenschaft, beim Erreichen der stationären Phase kaum noch zellgebundene Pili aufzuweisen (siehe Abbildung 3).

Da die Mutante beide Phänotypen in dem Wirtsstamm, in dem sie isoliert wurde, und in dem neuen geißellosen Wirtsstamm zeigt, folgt daraus, daß die Mutation auf dem F Faktor kartiert.

Genetische und physikalische Untersuchungen des Konjugationsprozesses ergaben die in Abbildung 5 dargestellte Karte des für den DNA Transfer notwendigen Teil des F

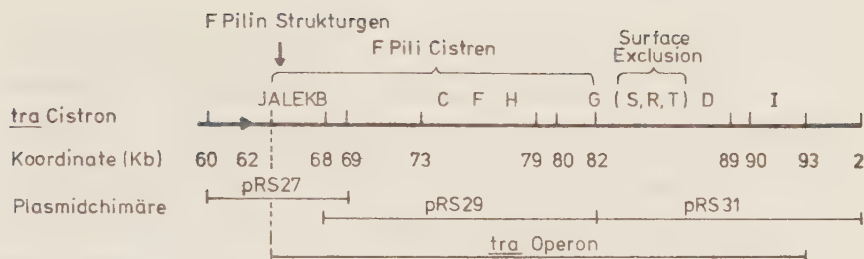


Abbildung 5: Karte der *tra* Region des F Faktors.

Erklärung siehe Text.

Faktors. Aus genetischen Untersuchungen des Konjugationsprozesses ist bekannt, daß sowohl der eigentliche DNA Transfer als auch die F Pilussynthese auf dem Niveau der Transkription in zwei Operons reguliert werden (Helmuth und Achtman, 1975). In dem ersten liegt das Cistron *traJ*, dessen Genprodukt positiv auf die Transkription des zweiten Operons wirkt (Willettts, persönliche Mitteilung). Es reicht von *traA* bis *traI* und faßt alle anderen 14 *tra* Cistren zusammen. Lediglich Mutanten in den Cistren von *traA* bis *traG* können keine F Pili synthetisieren und sind deswegen auch resistent gegen männlich spezifische Bakteriophagen (Achtman et al., 1971; Achtman et al., 1972; Willettts, 1973). Alle anderen eingezeichneten Cistren zeigen keinen Einfluß auf die F Pili und haben entweder einen direkten Einfluß auf den DNA Transfer (*traD*, *traI*) oder betreffen die schlechte Rezipientenfähigkeit (surface exclusion) der F^+ Zellen (Achtman, persönliche Mitteilung).

Um nun den Mutationsort der isolierten Mutante grob zu kartieren, wurden Komplementationsversuche unternommen. Zu diesem Zweck wurden in vitro erzeugte Plasmidchimären benutzt. Skurray et al. (1976) ist es gelungen, EcoR1 erzeugte Restriktionsfragmente des F Faktors in E. coli zu klonen. Dabei wurde der R Faktor pSC101 als Vektor benutzt. Dieser verleiht allen Stämmen die Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin. Die von den einzelnen Chimären getragenen Bereiche der tra Region sind in Abbildung 5 dargestellt. Für den Fall, daß die Mutation von MPFL57 recessiv ist und durch eines dieser Plasmidchimären komplementiert werden kann, ist zu erwarten, daß auch ein Stamm, der den mutierten Flac Faktor und die Chimäre trägt, beim Erreichen der stationären Phase wenig zellgebundene F Pili aufweist.

Die erhaltenen Ergebnisse der F Pili pro Zelle in Abhängigkeit von der Zeit und dem Genotyp der Stämme zeigt Abbildung 6. Man sieht deutlich, daß die beiden Plasmidchimären pRS27 und pRS29 die Mutation von MPFL57 komplementieren können (Abbildung 6 a, b). Nach dem Erreichen der stationären Phase fällt bei ihnen, wie beim Wildtypstamm, die Zahl der F Pili pro Zelle auf einen Wert unter 0,5. Lediglich das Plasmid pRS31 zeigt keine Komplementation, da der Stamm, der pRS31 und MPFL57 trägt, auch in der stationären Phase noch 1,4 Pili pro Zelle hat (Abbildung 6 c). Die Zahl des vergleichbaren Kontrollstamms, der JCFL0 und pRS31 trägt, sinkt wie in allen anderen Fällen auf einen Wert

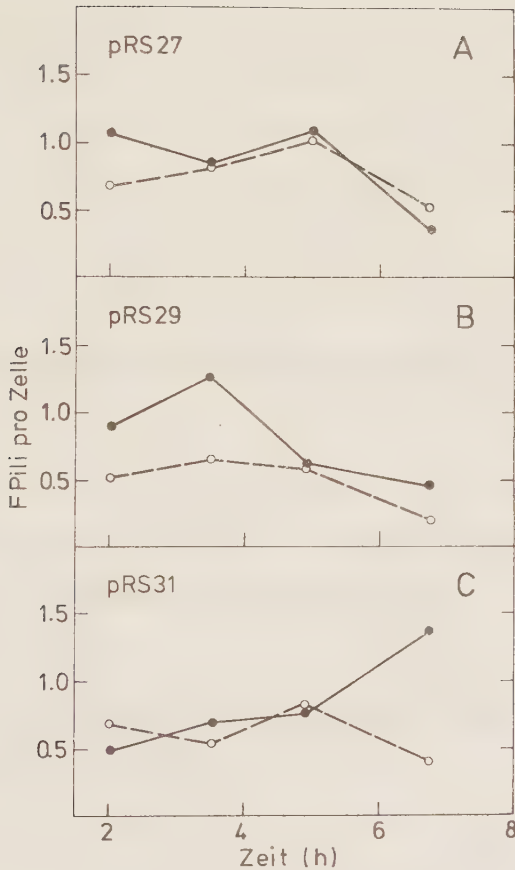


Abbildung 6: Komplementation des Mutanten Flac Faktors MPFL57. Abbildung 6 zeigt die F Pili pro Zelle in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach dem Wachstumsbeginn einer Wildtyp $\circ-\circ$ und Mutanten $\bullet-\bullet$ Kultur, deren Wirtsstamm jeweils eine der angegebenen Plasmidchimären trägt.

unter 0,5 Pili pro Zelle. Es folgt also, daß sowohl Cistren auf pRS27 als auch pRS29 die Mutation von MPFL57 komplementieren können und die Mutation ein Protein betreffen muß, da sie rezessiv ist.

3.2. Die F Pilusisolationismethode

3.2.1. Beobachtungen bei der Entwicklung der Isolationismethode.

Am Beginn der hier beschriebenen Arbeit war es trotz mehrerer Versuche nicht möglich, die F Pili des Wildtyp Flac Faktors JCFL0 zu isolieren. Das hatte im wesentlichen zwei Gründe:

1. F Pili zeigen eine starke Tendenz, sich seitlich aneinander zu lagern und dadurch F Piluskristalle zu bilden. Diese sind so groß, daß sie sogar im Lichtmikroskop nachgewiesen werden können. Sie haben jedoch den Nachteil, daß sie durch einfache Zentrifugation nicht von Bakterienzellen zu trennen sind. Außerdem werden bei ihrer Entstehung auch kleinere Unreinheiten in das Kristallgefüge mit eingeschlossen.
2. Die F Pilusausgangsmenge einer Wildtypkultur ist so gering, daß sie es kaum ermöglicht, die Gelelektrophorese zur quantitativen Bestimmung des F Pilusgehaltes einer Fraktion einzusetzen.

Erst nach der Isolation einer Mutante, die mehr F Pili als der Wildtyp trägt, gelang es, F Pili in Mengen zu isolieren, die für eine gelelektrophoretische Analyse des Pilus ausreichten. Sie ergab, daß das F Piluspräparat hauptsächlich eine Proteinbande mit sehr niedrigem Molekulargewicht enthielt. Diese Proteinuntereinheit des F Pilus wird F Pilin genannt und ist im Disk-Gelsystem gut nachweisbar, da es im Gegensatz zum Plattengelsystem gestattet, große Probenmengen zu analysieren. Erst nach dieser Identifikation der F Pilinbande in einem geeigneten quantitativen Gelsystem und durch die Verwendung der Mutante war es möglich, den F Pilusgehalt einzelner Reinigungsstufen quantitativ zu bestimmen und dadurch die F Pilusisolationmethode zu entwickeln.

3.2.2. Beschreibung der Isolationsmethode anhand einer Wildtyp F Pilusisolation.

Die angewandte Methode zur Isolation biologisch aktiver F Pili setzt sich aus acht Hauptreinigungsschritten, die in Abbildung 7 in ihrer Kurzbezeichnung aufgeführt sind, zusammen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse und Erfahrungen sollen hier nun am Beispiel einer Wildtyp F Pilusisolation zusammengefaßt werden. Die experimentellen Details der Methode und eine Anleitung zur F Pilusisolation sind im Appendix der Arbeit beschrieben.

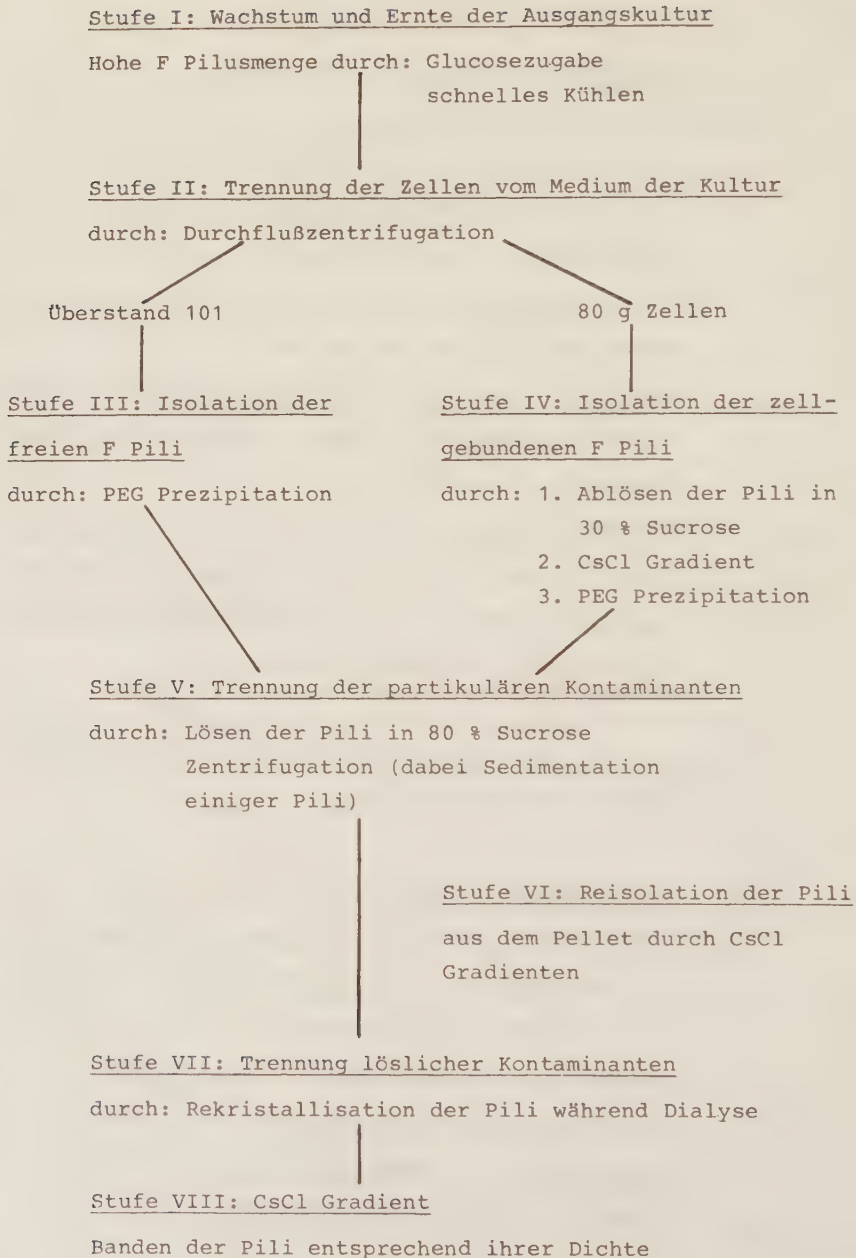


Abbildung 7: Die acht Hauptstufen der F Pilusisolationsmethode

Zu Stufe I: Wachstum und Ernte der Ausgangskultur

Das Ziel der angewandten Inkubationsmethode ist es, einen möglichst hohen Zell- und damit F Pilustiter zu erreichen. Dieser wird sowohl durch heftige Belüftung der Kultur als auch durch Glucosezugabe nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase hervorgerufen. Wird die stationäre Phase zum zweiten Mal erreicht, erfolgt ein sehr schnelles Abkühlen der Kultur. Als Grund dafür ist die Beobachtung von Novotny und Lavin (1971) anzusehen, die herausfanden, daß ein großer Prozentsatz der zellgebundenen F Pili bei 25° retrahiert wird. Bei Temperaturen unter 10° läuft diese Reaktion nur verlangsamt oder gar nicht ab. Durch die direkte Zugabe von Eis in den Fermentor wird der kritische Temperaturbereich schnell durchlaufen und es ist zu erwarten, daß keine Verluste an F Pili auftreten.

Zu Stufe II: Trennung der Zellen vom Medium der Kultur

Während einer Durchflußzentrifugation wird die Kultur in 10 l Durchfluß und ca. 80 g Zellen aufgetrennt. Der Durchfluß enthält noch ca. 3×10^7 Zellen/ml und dient als Quelle zur Isolation der von den Zellen spontan ins Medium abgegebenen freien F Pili. Außerdem sind in ihm auch die Pili enthalten, die während der Durchflußzentrifugation von den Zellen abbrechen. Es konnte durch eine elektronenmikroskopische Bestimmung der Pili vor und nach der Zentrifugation gezeigt

werden, daß das für ca. 75 % der zellgebundenen F Pili der Fall ist. Das Zellpellet enthält ca. 80 - 90 g Zellen (Naßgewicht) und einige Piluskristalle, die sich spontan vor und während der Zentrifugation geformt hatten. Es dient zur Isolation der zellgebundenen F Pili.

Zu Stufe III: Isolation der freien F Pili

Die frei im Überstand der 10 l Kultur vorliegenden F Pili werden durch 2 % Polyethylenglycol bei 0,5 M NaCl präzipitiert. Sinn dieses Schrittes ist es, die einzeln vorliegenden freien Pili in Pseudokristalle umzuwandeln und sie dadurch konzentrierbar zu machen. Diese Präzipitation wird durch das PEG hervorgerufen, für das gezeigt werden konnte, daß es speziell filamentartige Makromoleküle und F Pili präzipitiert (Tomoeda et al., 1976).

Die durch das PEG entstandenen F Pilusaggregate können dann durch eine Zentrifugation konzentriert werden. Bei der hier beschriebenen Isolation der Wildtyp F Pili ließen sich in den gesamten 10 l des Durchflusses vor der Konzentration der Pilusaggregate durch Zentrifugation gelelektrophoretisch 6 - 9 mg F Pilin nachweisen. Nach der Zentrifugation waren noch 7,5 mg F Pilin nachweisbar. Es tritt folglich bei dieser Isolationsstufe kein signifikanter Verlust an F Pili auf.

Zu Stufe IV: Isolation der zellgebundenen F Pili

Die zellgebundenen F Pili können aus dem Zellpellet der Durchflußzentrifugation isoliert werden. Dazu werden die Zellen in 30%iger Sucrose resuspendiert. Das hat zur Folge, daß ca. 95 % aller Pili abgelöst werden (Tomoeda et al., 1976). Anschließend können sie aufgrund ihrer geringeren Dichte von den Zellen auf einem CsCl Dichtegradienten abgetrennt werden. Die Verteilung der Banden nach der Zentrifugation zeigt Abbildung 8. Deutlich sind zwei Banden in der Mitte des Bechers und ein dickes Sediment am Boden festzustellen. Im Lichtmikroskop konnte beobachtet werden, daß die oberste Bande zum größten Teil F Piluskristalle, einige Zellen und Zellvesikel enthält. Die zweite Bande ist sehr diffus und liegt zwischen der F Pilusbande und dem Zellpellet am Boden. Sie setzt sich aus Piluskristallen und Zellen zusammen. Dabei nimmt der Anteil der Kristalle mit steigender Dichte ab. Das Pellet des Gradienten zeigte nur Zellen.

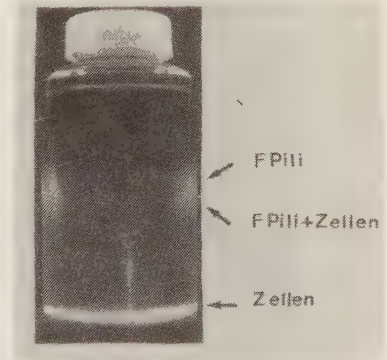


Abbildung 8: Gradient zur Isolation zellgebundener F Pili. Das Volumen solch eines Bechers beträgt 250 ml.

Über der F Pilusbande befinden sich alle einzelnen F Pili und alle F Piluskristalle, die nicht groß genug sind, bei

dieser Zentrifugation gebandet zu werden. Die einzelnen F Pili und die F Pilusbande werden gesammelt und durch PEG Fällung und anschließende Zentrifugation konzentriert. Bei der Wildtyp F Pilusisolation läßt sich danach 0,5 mg F Pilin nachweisen.

Zu Stufe V: Abtrennung partikulärer Kontaminanten

Schaut man sich das PEG Präzipitat sowohl der freien als auch der zellgebundenen F Pili (resuspendiert in Tris EDTA) unter dem Lichtmikroskop oder Elektronenmikroskop an, sieht man, daß eine große Zahl von Zellen in das Maschenwerk der Piluskristalle eingebettet sind (siehe Abbildung 9). Außerdem können in der elektronenmikroskopischen Aufnahme eine Vielzahl von vesikelartigen Strukturen festgestellt werden. Sie und die Zellen stellen "partikuläre Kontaminanten" der F Piluspräparation dar und müssen von den Pseudokristallen getrennt werden. Dazu müssen die Kristalle aufgelöst werden, da sie sonst bei einer Zentrifugation das gleiche Sedimentationsverhalten wie die Zellen zeigen.

Brinton hat bewiesen, daß F Pili in 30 % Sucrose löslich sind (Brinton, 1971). Versuche hingegen, die F Piluskristalle unter ähnlichen Bedingungen in 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % Sucrose Triton X-100, Glycerin und NaCl aufzulösen, gaben jedoch kein positives Resultat. Lediglich in 80%iger Sucrose ließen sich die Piluskristalle auflösen.

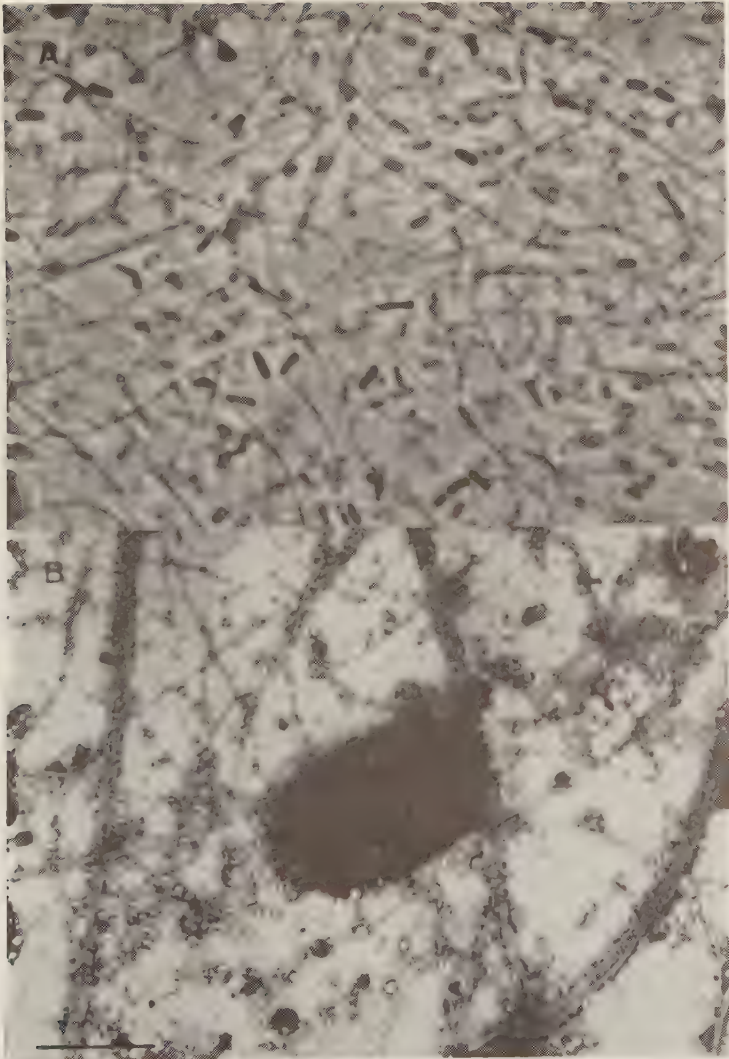


Abbildung 9: Lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahme eines F Pilus PEG Präzipitats.
A) Lichtoptisch (Phasenkontrast) 1000 x
b) Elektronenoptisch 22.000 x

Eine elektronenoptische Aufnahme in 80 % Sucrose gelöster F Pili zeigt Abbildung 10. Hierbei sind die Pili aus technischen Gründen mit Platin bedampft und nicht negativ kontrastiert.



Abbildung 10: Elektronenoptische Aufnahme in 80 % Sucrose gelöster F Piluskristalle. Vergrößerung 30.000 x, Platin bedampft.

Nach dem Lösen der Pili in 80%iger Sucrose können die partikulären Kontaminanten durch eine Zentrifugation abgetrennt werden. Da aber 80%ige Sucrose aufgrund ihrer Viskosität eine Sedimentation der partikulären Kontaminanten nicht zuläßt, muß das Präparat vor der Zentrifugation auf eine Sucrosekonzentration von 30 % verdünnt werden. Während der Zentrifugation findet aber eine Rekristallisation der F Pili statt, die man lichtoptisch verfolgen kann. Dadurch sedimentieren ca. 20 % der F Pilusaussgangsmenge zusammen mit den Zellen.

Zu Stufe VI: Reisolation der F Pili

Die bei der vorherigen Präparationsstufe verlorenen F Pili können zu 90 % durch einen CsCl Stufengradienten reisoliert werden.

Zu Stufe VII: Trennung löslicher Kontaminanten

Das nunmehr zellfreie Präparat enthält hauptsächlich Kontaminanten, die wegen ihrer Größe bei einer Zentrifugation zusammen mit den F Pili oder erst viel später sedimentieren. Um diese von den Pili zu trennen, wurden sie in einem großvolumigen, hängenden Dialyseschlauch rekristallisiert. Die entstandenen Kristalle sind dann so groß und schwer, daß sie während der Dialyse in dem Schlauch zu Boden sinken und dadurch von allen löslichen Kontaminanten getrennt werden können. Dazu wurde der Dialyseschlauch über dem

lockeren Sediment der Kristalle angestochen. Dadurch fließen alle nicht sedimentierten Kontaminanten ab. Das Restmaterial wird in einem Zentrifugationsschritt sedimentiert und in Sucrose aufgelöst. Dabei sind im Material über dem Sediment des Dialyseschlachs 2,8 mg und im Überstand der Zentrifugation 1,2 mg F Pilin enthalten. Daraus folgt, daß beim Wildtyp ca. 50 % der F Pilusausgangsmenge nicht in Kristallen vorliegen, die groß genug sind, um unter diesen Bedingungen zu sedimentieren.

Zu Stufe VIII: Hochgeschwindigkeits CsCl Gradient

Die im vorigen Reinigungsschritt in Sucrose gelösten 4 mg F Pili werden nun durch einen Hochgeschwindigkeits CsCl Dichtegradienten weiter gereinigt. Das Bild solch eines Gradienten zeigt Abbildung 11. Es sind deutlich drei Banden zu erkennen. Die stärkste obere Bande (1) zeigt im Lichtmikroskop nur F Piluskristalle. Darunter folgt eine sehr diffuse Bande (2), die F Piluskristalle, Zellen, Minizellen und Vesikel enthält. In ihrer Mitte beginnt eine breit verlaufende, starke Bande (3), die ganze Zellen, die mit einem zum Röhrenboden hin abnehmenden Anteil an F Piluskristallen versetzt sind, enthält.

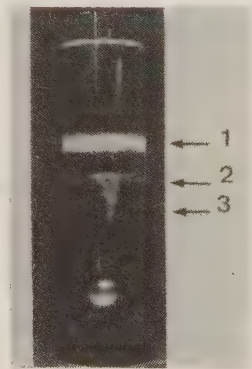


Abbildung 11: CsCl Hochgeschwindigkeits Dichtegradient der Stufe VIII. Erklärung siehe Text.



Abbildung 12: Lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahme eines F Piluspräparates.

A) Lichtmikroskopisch (Interferenzkontrast) 1000 x

B) Elektronenmikroskopisch 25.000 x

Die Bande 1 des Gradienten stellt nach Dialyse gegen Tris EDTA das endgültige F Piluspräparat dar. Eine licht- und elektronenoptische Aufnahme solch eines Präparates zeigt Abbildung 12. Dabei sind nur einzelne F Pili und F Piluspseudokristalle zu erkennen, jedoch keine Zellen oder andere kontaminierende Strukturen. (Vergleiche auch mit dem Ausgangsmaterial in Abbildung 9.)

3.2.3. Es werden 2 mg Wildtyp F Pili von 99 % Reinheit isoliert.

Die Proteinverteilung einer Wildtyp F Pilus Präparation zeigt Abbildung 13. Dabei wurden einmal 10 μ l ($\hat{=}$ 4 μ g) und einmal 100 μ l ($\hat{=}$ 40 μ g) des Endpräparates analysiert. Es ist deutlich zu sehen, daß das Gel, auf dem 10 μ l geladen wurden, keine kontaminierenden Banden aufweist. Lediglich in dem mit 100 μ l in Bezug auf die Pili überladenen Gel läßt sich eine schwache, kontaminierende Bande nachweisen. Außerdem zeigt es am Anfang des Gels Material mit einem sehr hohen Molekulargewicht. Es setzt sich aus undenaturierten F Pili zusammen. Dafür spricht vor allem das Fehlen dieser Bande bei dem mit 10 μ l nicht überladenen Gel. Trotzdem wurde auch dieses Material in die Berechnung der Menge des kontaminierenden Proteins mit einbezogen. Mit dieser Methode konnten in einem Wildtyp F Piluspräparat 1,75 mg von mehr als 99 % Reinheit und im zweiten 1,9 mg von mehr als 96 % Reinheit nachgewiesen werden. Die gezeigte Abbil-

Abbildung zeigt die Proteinverteilung des unsauberen Präparates.

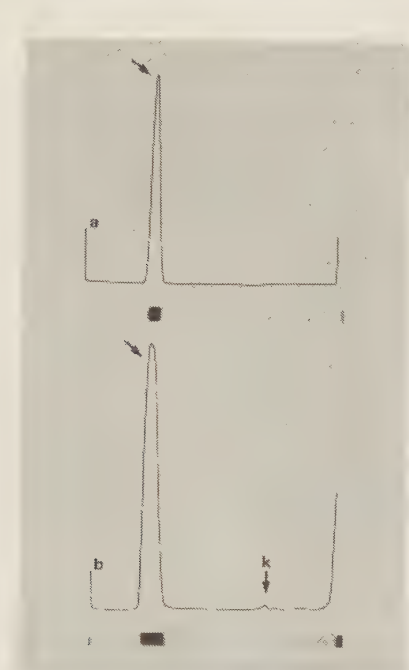


Abbildung 13: Proteinverteilung eines Wildtyp F Piluspräparates.

a) 10 μ l, b) 100 μ l geladen. Der Pfeil gibt die Position der F Pilin Bande an. K = Position der kontaminierenden Bande. (Elektrophoreserichtung von rechts nach links)

3.2.4. Die Wildtyp F Pili haben eine Dichte von 1,200 g/cm³

Die Dichte eines Wildtyp F Piluspräparates konnte, da es homogener als ein Mutantenpräparat ist, sehr einfach bestimmt werden. Abbildung 14 zeigt die Profile zweier CsCl Dichtegradienten beider Wildtyp F Piluspräparate. In beiden Fällen lag die Dichte der Pili bei $1,200 \pm 0,006$ g/cm³.

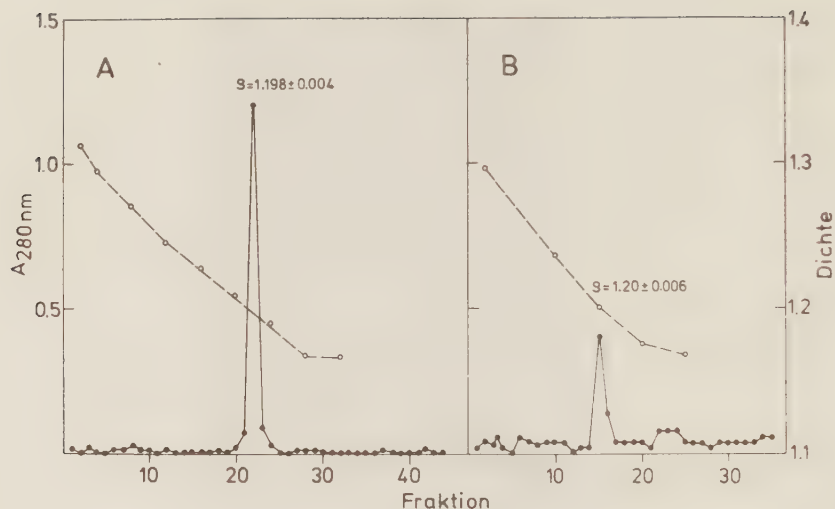


Abbildung 14: Dichtebestimmung beider Wildtyp F Piluspräparate. A) Präparat I, B) Präparat II. Die Zahl hinter der Dichtenangabe gibt den Dichteunterschied zwischen zwei Fraktionen im Bereich der F Pilusbande an.

3.2.5. Ergebnisse und Vergleiche einzelner Wildtyp und Mutanten F Pilusisolationen

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden je zweimal die F Pili des Wildtyps und der Mutante isoliert. Deswegen sollen in diesem Kapitel kurz die Hauptunterschiede zwischen den einzelnen Isolationen und besonders die zwischen dem Wildtyp und der Mutante aufgeführt werden. Die geleelektrophoretisch nachweisbaren Mengen F Pilin der einzelnen Isolationsstufen zeigt Tabelle 3.

Stufe	Bezeichnung	Volumen in ml	Wildtyp		Mutante Isolation I+II
			Isolation I	Isolation II	
II	Medium der Kultur	10000	8		
III	freie F Pili	36	7,5	2,6	8
IV	zellgebundene F Pili	12	0,5	0,5	2,3
III+IV	Ausgangsmenge		8	3,1	10,3
V	Abtrennung partikulärer Kontaminanten	48	6,3		7,9
VI	Reisolation	18	1,5		2,1
V+VI		250	7,8		10,06
VII	Trennung löslicher Kontaminanten	42	4	2,7	9,5
VIII	CsCl Gradient	5	1,95	1,75	7 1
	Bande I	5			4,6 2
	Bande II	5			2,0 2
	Ausbeute		24 %	56,4 %	50 %

Tabelle 3: F Pilingehalt einzelner F Pilusisolationsstufen.
Angaben in mg, 1 Isolation I, 2 Isolation II

Vergleicht man zuerst die beiden durchgeführten Isolationen der Wildtyp F Pili, liegt der Hauptunterschied in der Menge der freien F Pili. Bei der Isolation I wurden die Zellen kurz nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase geerntet. Es sind dann 7,5 mg freie F Pili nachweisbar. Isolation II hingegen wurde erst 60 min nach dem Erreichen der stationären Phase geerntet. In diesem Fall sind jedoch nur 2,6 mg freier F Pili vorhanden. Dieser Befund läßt vermuten, daß die freien F Pili innerhalb einer Stunde nach dem Erreichen der stationären Phase abgebaut werden.

Wesentlich größere Unterschiede zeigen sich jedoch beim Vergleich der Wildtyp und Mutanten Isolationen. In der Tabelle sind für die Mutante nur die Werte einer Isolation aufgeführt, da zwischen den einzelnen Mutanten F Pilusisolationen keine wesentlichen Unterschiede bestanden.

Abbildung 15 zeigt ein Histogramm der vorhandenen zellgebundenen F Pili vor der Glucosezugabe und zum Zeitpunkt der Ernte einer Wildtyp und Mutantenkultur. Es läßt sich feststellen, daß die durchschnittliche Menge der zellgebundenen F Pili der Mutante fünf- bis sechsmal höher liegt als die des Wildtyps. Dieses Verhalten bestätigt sich auch bei der gelelektrophoretischen Bestimmung des F Pilin Gehaltes der zellgebundenen F Pili auf Stufe IV der Präparation. Hierbei lassen sich bei der Mutante 2,3 mg und beim

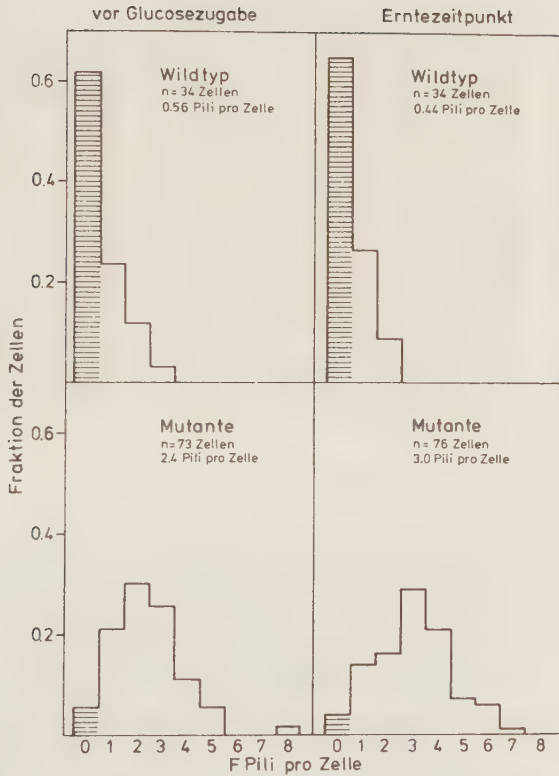


Abbildung 15: Verteilung der F Pili pro Zelle für den Wildtyp und Mutanten Flac Faktor vor der Glucosezugabe und zum Erntezeitpunkt der Kultur. Die Histogramme der Mutante setzen sich aus den Ergebnissen zweier Versuche zusammen.

Wildtyp 0,5 mg F Pilin nachweisen (siehe Tabelle 3). Die Proteinverteilung beider Präparate auf dieser Isolationsstufe zeigt Abbildung 16 a, b. Bei dieser Art der Dar-

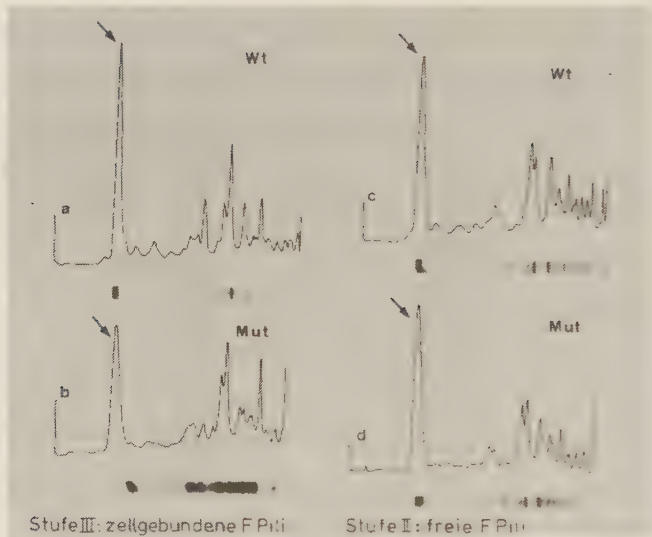


Abbildung 16: Proteinverteilung der Stufe II und Stufe III der F Pilusisolation: a, c für den Wildtyp; b, d für die Mutante. Der Pfeil gibt die Position der F Pilusbande an. (Elektrophoreserichtung von rechts nach links)

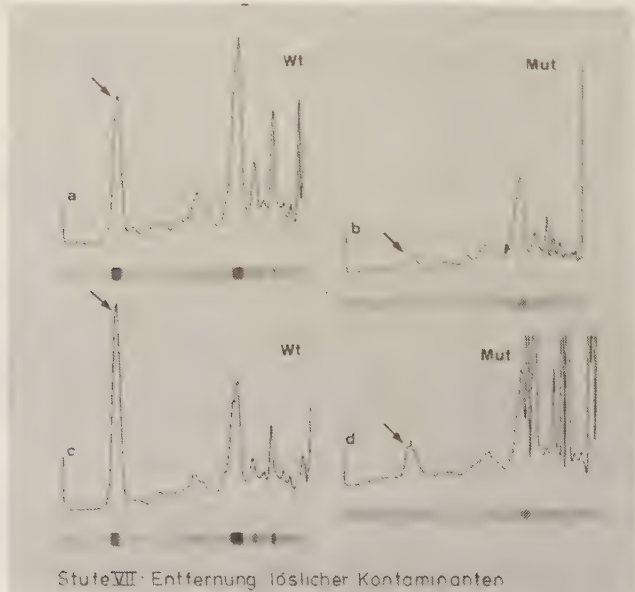


Abbildung 17: Proteinverteilung des auf Stufe VII verworfenen Materials: a, b Material über dem Sediment des Dialyseschlauchs; c, d Überstand der Zentrifugation. (Elektrophoreserichtung von rechts nach links)

stellung lassen sich die Stärken der Pilusbanden beider Isolationen nicht direkt vergleichen, da unterschiedliche Mengen Protein auf die Gele aufgetragen wurden. Die Gele zeigen jedoch qualitativ, daß das Präparat der Mutanten F Pili auf dieser Stufe wesentlich kontaminierter als das der Wildtyp F Pili ist. Das ist auf die noch später beschriebene Tendenz der Mutanten, F Pili Kristalle zu bilden und dabei Verunreinigungen einzuschließen, zurückzuführen.

Schaut man sich in Tabelle 3 die Mengen der auf Stufe III isolierten freien F Pili an, liegt der Gehalt an F Pilin der Wildtypisolation I und der Mutanten F Pilusisolation in beiden Fällen bei 8 mg. Es muß jedoch betont werden, daß die Kultur der Wildtyp F Pilusisolation I nur zufällig kurz nach dem Punkt der höchsten F Pilusproduktion geerntet werden konnte. In den meisten Fällen wird die Ernte der Kultur aus experimentellen Gründen erst viel später erfolgen. Deswegen stellt die Wildtyp F Pilusisolation II einen besseren Vergleich zur Mutante dar. In beiden Fällen wurde 60 min nach dem Erreichen der stationären Phase geerntet und es lassen sich für den Wildtyp nur 2,6 mg und für die Mutante 8 mg F Pilin nachweisen. Die Proteinverteilung der Präparate auf dieser Stufe zeigt Abbildung 16 c, d.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zeigt sich bei der Trennung der Pili von den löslichen Kontaminanten (Stufe VII). Abbildung 17 a, c zeigt die

Proteinverteilung des verworfenen Materials einer Wildtyp F Pilusisolation auf dieser Reinigungsstufe. Im oberen Teil der Abbildung (17 a) wurde die Flüssigkeit über den Flocken im Dialyseschlauch und im unteren Teil (17 b) die Proteinverteilung des Überstandes der anschließenden Zentrifugation analysiert. Die vergleichbaren Proben einer Mutanten F Pilusisolation zeigt Abbildung 17 b, d.

Aus der Mengenbestimmung des F Pilingehaltes obiger Gele ergibt sich, daß im Fall einer Wildtyp Isolation bei diesem Schritt 4 mg entsprechend 50 % der F Pilusausgangsmenge verloren gehen. Im Fall der Mutanten F Pilusisolation hingegen ließen sich nur 10 % der F Pili im verworfenen Material nachweisen. Daraus kann gefolgert werden, daß mehr als 90 % der Mutanten F Pili in so großen Aggregaten vorliegen, daß sie im Dialyseschlauch zu Boden sinken. Beim Wildtyp hingegen liegen nur 50 % der Pili in so großen Aggregaten vor.

Dieser Schluß wird auch durch die in Abbildung 18 a, b gezeigte Proteinverteilung unterstützt. Sie zeigt das nach der Entfernung der löslichen Kontaminanten wiedergewonnene Material. Im Falle des Wildtyps (18 a) sind nur zwei schwache, kontaminierende Banden nachweisbar. Bei den Mutanten Pili aber sedimentierten mehrere kontaminierende Proteine mit den F Piluskristallen (18 b).

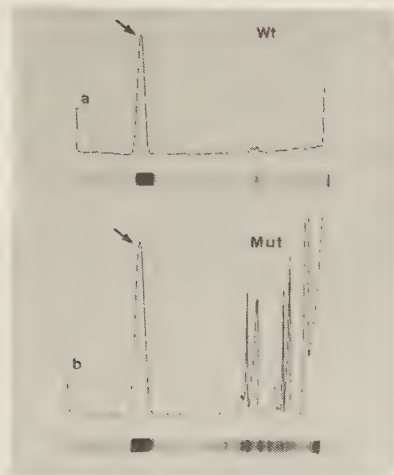


Abbildung 18: Proteinverteilung vor dem letzten CsCl Dichtegradienten. a) Wildtyp, b) Mutante.
(Elektrophoreserichtung von rechts nach links)

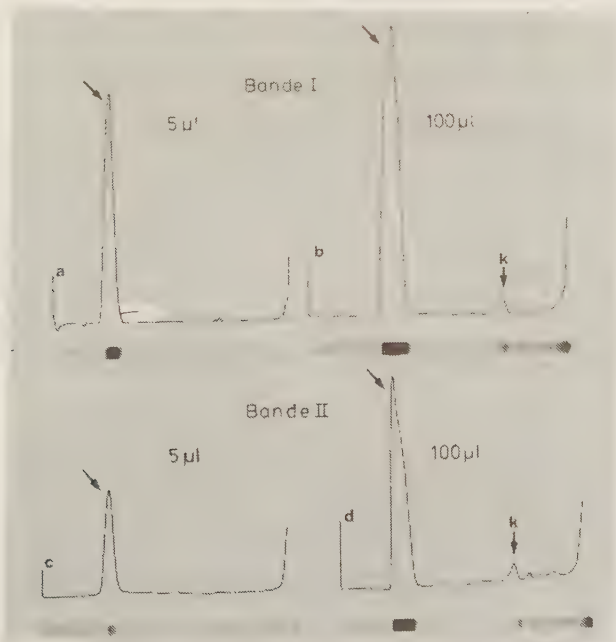


Abbildung 19: Proteinverteilung beider Banden eines Mutanten F Piluspräparats. K = Position der kontaminierenden Banden. (Elektrophoreserichtung von rechts nach links)

3.2.6. Es werden 7 mg Mutanten F Pili von 90 % Reinheit isoliert.

Für die Mutante konnten bei einer Präparation 7,3 mg F Pilin von 90 % Reinheit nachgewiesen werden. Bei der zweiten durchgeführten Isolation und im Verlauf der Analyse der Dichte der Mutanten F Pili (siehe 3.3.1.) stellte es sich jedoch heraus, daß die F Pilusbande des letzten CsCl Gradienten aus zwei eng benachbarten Banden zusammengesetzt ist. Diese liegen so eng zusammen, daß es nur bei einer Mutanten F Pilusisolation möglich war, sie zu trennen. Von beiden Banden wurden dann je 5 μ l ($\approx$ 5 μ g) und 100 μ l ($\approx$ 10 μ g) gelelektrophoretisch analysiert. Die erhaltene Proteinverteilung zeigt Abbildung 19. Auch hier lassen sich, wie beim Wildtyp, kontaminierende Proteine nur bei einem in Bezug auf die Pili überladenen Gel nachweisen. Dabei enthält die erste Bande (19 a, b) 4,6 mg F Pilin von mehr als 93 % Reinheit und die zweite Bande (19 c, d) 1,2 mg von 76 % Reinheit. Das kontaminierende Protein kann folglich kein Bestandteil der Pili sein, da es in keinem stöchiometrischen Zusammenhang zu den Pili steht. Sein Gehalt nimmt im Verlauf der Reinigung immer mehr ab.

Die in diesem Abschnitt und unter 3.2.3. beschriebenen F Pilusmengen und Reinheitsgrade ermöglichen es, fast alle biochemischen und strukturellen Untersuchungen an F Pili

durchzuführen. Aus diesem Grund bietet die entwickelte Methode eine Grundlage zur routinemäßigen Isolation großer Mengen an F Pili.

3.3. Biochemische Untersuchungen der isolierten F Pili

3.3.1. Die Mutanten F Pili haben eine Dichte von 1,200 g/cm³

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, zeigt sich bei der Mutante im letzten CsCl Gradienten der Isolationsmethode eine Doppelbande, die nur schwer in Einzelfractionen aufzutrennen ist. Dabei ist die leichtere Bande wesentlich homogener, denn sie enthält nicht mehr als 10 % eines kontaminierenden Proteins. Die schwere Bande jedoch enthält davon zwischen 20 % und 30 %. Einen CsCl Gradienten der ersten Fraction zeigt Abbildung 20 A) und der zweiten Abbildung 20 B). Es ist auffällig, daß die erste Fraction scharf an einer

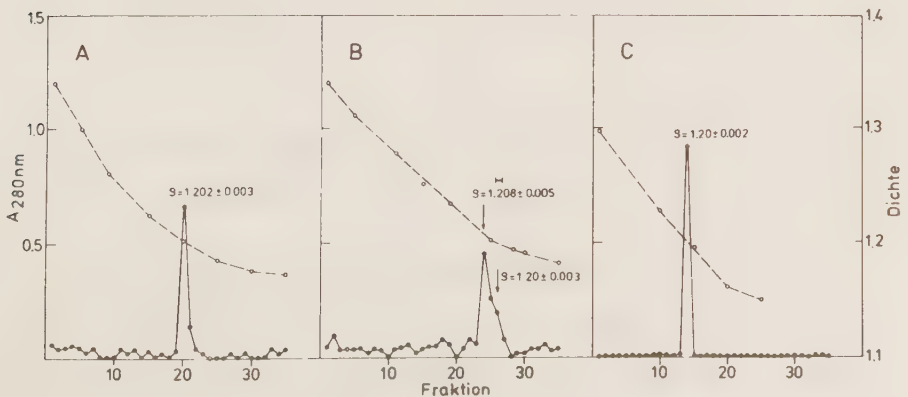


Abbildung 20: Dichtebestimmung eines Mutanten F Piluspräparates. A) Bande I, B) Bande II, C) 2. Gradient des durch H^3 markierten Materials der Bande II.

Dichteposition von $1,202 \text{ g/cm}^3$ bandet, während der Hauptteil der zweiten Fraktion an der schweren Position von $1,208 \text{ g/cm}^3$ mit einer Schulter zur Dichte von $1,200 \text{ g/cm}^3$ liegt. Nimmt man dieses leichte Material und analysiert es in einem weiteren Gradienten, bandet es homogen mit einer Dichte von $1,200 \text{ g/cm}^3$ (siehe Abbildung 20 C).

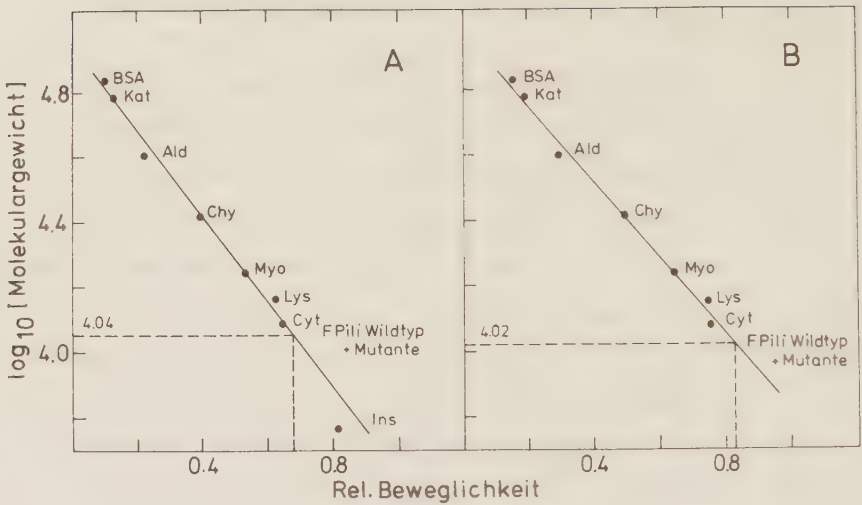
Bei allen durchgeführten Dichteanalysen wurde das Material der Gipfelposition auch gelelektrophoretisch und lichtmikroskopisch analysiert. Dabei ließen sich im Lichtmikroskop nur Piluskristalle und keine Verunreinigungen beobachten. Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe der Gelelektrophorese gezeigt werden, daß F Pili, die einen hohen Gehalt der kontaminierenden Bande aufweisen, auch eine höhere Dichte haben als weniger kontaminierte F Pili. Lediglich bei dem in Abbildung 20 C gezeigten Material ließ sich das kontaminierende Protein nicht nachweisen. Gleichzeitig haben diese Pili auch die geringste Dichte. Sie entstammten einer zu fast 30 % kontaminierten schweren Bande der Mutanten F Pilusisolation und konnten trotzdem nach zweimaliger Reinigung im Dichtegradienten in homogenes Material mit einer Dichte von $1,200 \text{ g/cm}^3$ umgewandelt werden.

Diese Dichte wurde auch für die F Pili des Wildtyps ermittelt. Wildtyp und Mutanten F Pili haben folglich die gleiche Dichte von $1,200 \pm 0,002 \text{ g/cm}^3$.

3.3.2. F Pilin hat ein Molekulargewicht von 10.750 d

Die bisher gezeigten gelelektrophoretischen Untersuchungen während der Reinigung der F Pili haben gezeigt, daß diese sich nur aus einer Proteinuntereinheit, dem F Pilin zusammensetzen. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß kein Protein auf den Gelen nachzuweisen ist, das in einem festen Mengenverhältnis zu den F Pili steht. Zu dem gleichen Ergebnis kam Brinton (1971). Er konnte für die F Pilinuntereinheit unter Anwendung verschiedener Methoden ein Molekulargewicht von 11.800 d festlegen. Um dieses Ergebnis mit unseren Pili zu vergleichen und festzustellen, ob die Untereinheit der Wildtyp und Mutanten F Pili das gleiche Molekulargewicht haben, wurden Molekulargewichtsbestimmungen durchgeführt.

Hierzu wurde die gelelektrophoretisch ermittelte Beweglichkeit der Wildtyp und Mutanten F Pili mit denen verschiedener Eichproteine verglichen. Das Resultat solcher Analyse in einem 12%igen 2-Phasen Weber Osborne Platten- und 10% Weber Osborne Disk-Gel zeigt Abbildung 21. Das Molekulargewicht der Wildtyp und Mutanten F Pili kann im 12 % Plattengel mit 10960 d und im 10 % Röhrchengel mit 10500 d bestimmt werden. Es ergibt sich ein Mittelwert von 10750 d Molekulargewicht für die Mutanten und Wildtyp F Pilus Untereinheit F Pilin. Der gleiche Wert ergibt sich auch aus den Berechnungen der Aminosäureanalyse (siehe 3.3.3.)



Abbildungung 21: Molekulargewichtsbestimmung der Wildtyp und Mutanten F Pilusuntereinheiten. Jeweils 5 μg des Standardproteins und der F Pili wurden gelelektrophoretisch analysiert. Die verwendeten Eichproteine sind:

BSA	Serumalbumin Hühnereiweiß	68000 d
Kat	Katalase	60000 d
Ald	Aldolase	40000 d
Chy	Chymotrypsinogen	25700 d
Myo	Myoglobin	17200 d
Lys	Lysozym	14300 d
Cyt	Cytochrom C	11700 d
Ins	Insulin	5700 d

Alle Proteine entstammen bis auf das Insulin (Cal Biochem) einer Boehringer (Mannheim) Kombihek.

Abbildungung 21 A zeigt die relative Beweglichkeit der Proteine in Abhängigkeit zum Logarithmus des Molekulargewichts in einem 12%igen Weber Osborne Plattengel.

Abbildungung 21 B zeigt die gleiche Darstellung für ein 10%iges Weber Osborne Disk-Gel.

Dieser Wert liegt damit um 1000 d niedriger als der von Brinton beschriebene.

Bei allen gelelektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmungen wurden die F Pili 2 min bei 100° in Denaturierungspuffer gekocht. Proben, die 0, 5, 10 und 15 min gekocht wurden, zeigten die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit und schließen damit eine vorher nicht erkannte Multimerenbildung des Proteins aus.

3.3.3. F Pili sind hydrophob und es fehlen Arginin, Histidin und Prolin.

Tabelle 4 zeigt die Aminosäurezusammensetzungen der Wildtyp und Mutanten F Pili. Jeder gezeigte Wert ist ein Mittel aus den Einzelwerten zweier Analysen, unabhängig isolierter F Pilus Präparate. Zur Berechnung der Anzahl der einzelnen Aminosäuren wurde das gelelektrophoretisch ermittelte, mittlere Molekulargewicht von 10750 d benutzt. Dieses Molekulargewicht stellt auch dasjenige dar, für das die meisten Zahlen der errechneten Aminosäurereste nahe zu einer ganzen Zahl liegen. Aus ihm folgt, daß sich die F Pilusuntereinheit F Pilin aus 106 - 110 Aminosäuren zusammensetzt, wenn man ein mittleres Molekulargewicht von 120 d für eine Aminosäure ansetzt.

Bei der hier angewandten Analyse-methode konnten die Werte für Cystein und Tryptophan nicht ermittelt werden. Die Werte

	Wildtyp		Mutante		Brinton
	Mol %	Reste/Monomer	Mol %	Reste/Monomer	Reste/Monomer
Asp	6,62	7	7,18	8	8
Thr	6,06	6-7	5,92	6	6
Ser	8,96	10	10,33	11	11
Glu	4,22	5	4,84	5	4
Pro	0	0	0,46	0-1	0
Gly	12,99	14	12,89	14	15
Ala	13,86	15	13,44	14-15	15
Val	17,6	19	16,45	18	21
Met	6,35	7	5,38	6	8
Ile	2,66	3	2,79	3	4
Leu	6,58	7	6,55	7	9
Tyr	0,87	1	0,46	0-1	2
Phe	5,89	6	5,47	6	7
His	0		0	0	0
Lys	7,31	8	7,33	8	10
Arg	0	0	0,47	0-1	0
Summe	99,97	108-109	99,96	106-110	122

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der Wildtyp und Mutanten F Pili.

Tabelle 4 zeigt die Mol% und die Anzahl der einzelnen Aminosäurereste des Wildtyp und Mutanten F Pilins. Die letzte Spalte zeigt die von Brinton beschriebene Zahl der Aminosäurereste (1971). Unter der Spalte "Reste/Monomer" steht jeweils als Summe die Zahl der Aminosäuren, die notwendig sind, um eine F Pilusuntereinheit zu bilden.

für Thr, Ser, Val, Ile und Tyr wurden auf 70 h Hydrolysezeit nach Moore und Stein (1963) extrapoliert. Vergleicht man die für den Wildtyp und die Mutante gefundenen Werte, zeigen diese bei keiner Aminosäure einen signifikanten Unterschied. Die gelegentlich auftretenden Differenzen von einer Aminosäure liegen innerhalb der Fehlergrenze zweier Analysen. Das Wildtyp F Piluspräparat zeigt keine Spuren der Aminosäuren Prolin, Histidin und Arginin, während sich solche bis zu 0,5 Mol% bei der Mutante nachweisen lassen. Das kann jedoch auf den höheren Gehalt an kontaminierenden Proteinen der Mutanten F Pili zurückzuführen sein.

Die häufigsten Aminosäuren sind Valin und Alanin, die ca. 30 % des Gesamtproteins ausmachen. Außerdem fällt der hohe Anteil der hydrophoben Aminosäuren (Valin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Isoleucin und Tyrosin) von 40 % der Gesamtaminosäuren auf.

Die dritte Spalte der Tabelle zeigt die von Brinton (1971) ermittelten Werte. Leider hat er die Methode, die seinen Ergebnissen zugrunde liegt, nicht veröffentlicht. Deswegen ist es auch schwer zu entscheiden, wie verunreinigt die benutzten F Pili sind und welchen Einfluß eventuelle kontaminierende Proteine haben mögen. Es läßt sich jedoch feststellen, daß zwar quantitative Unterschiede vorliegen, die oben erwähnten qualitativen Merkmale der F Pilusaminosäurezusammensetzung jedoch gewahrt bleiben. Auch bei

Brinton sind Valin und Alanin am häufigsten und Prolin, Histidin und Arginin gar nicht vorhanden.

3.4. Biologische Untersuchungen an isolierten F Pili

Wie bereits erwähnt, war außer den biochemischen und physikalischen Eigenschaften der Pili besonders ihre biologische Aktivität von Interesse. Da über die Rolle der Pili bei der Konjugation nur Spekulationen möglich sind (Brinton 1965, 1971; Marvin und Hohn, 1969; Curtiss 1969), könnten aktive Pili wesentlich zur Aufklärung ihrer in vivo Funktion beitragen. Dabei sind aufgrund des Verhaltens zellgebundener F Pili zwei Fragen von besonderem Interesse.

1. Binden isolierte F Pili an F^- Zellen?
2. Binden die isolierten F Pili männlich spezifische Bakteriophagen?

Für den Fall, daß sich diese beiden Fragen positiv beantworten ließen, wäre nach beiden Kriterien der Nachweis der biologischen Aktivität der isolierten F Pili erbracht. Da jedoch für einen Teil der im weiteren beschriebenen Versuche die Immunprecipitation eine große Bedeutung hat, sollen hier vor der Beantwortung dieser Fragen kurz die gewonnenen Ergebnisse und Beobachtungen in Bezug auf die immunologischen Eigenschaften der F Pili dargestellt werden.

3.4.1. Die Wildtyp und Mutanten Pili sind kreuzreagierend und enthalten auch F^- spezifische Antikörper.

Antiseren gegen isolierte Wildtyp oder Mutanten F Pili konnten sowohl von Kaninchen als auch vom Schaf isoliert werden. Dabei ließ sich zeigen, daß gegen Wildtyp F Pili gewonnene Antiseren die Mutanten F Pili präzipitierten und umgekehrt. Die F Pili des Wildtyps und der Mutante sind also kreuzreagierend.

Zusätzlich war festzustellen, daß der Antikörpertiter eines Serums mit steigender Anzahl der Injektionen auch anstieg. Es konnten sowohl beim Schaf als auch beim Kaninchen Seren gewonnen werden, die auch nach 10.000facher Verdünnung F^+ Zellen noch deutlich mit dem Auge wahrnehmbar präzipitierten. Gleichzeitig jedoch wurden auch F^- Zellen bis zu einer 10fachen Verdünnung leicht präzipitiert.

Da die F Pilus spezifischen Antikörper zum Testen der Bindungsfähigkeit isolierter F Pili an F^- Zellen herangezogen werden sollen, war es notwendig, diese leichte Präzipitation der F^- Zellen zu beseitigen. Deswegen wurde zuerst versucht, unspezifische Effekte des Komplements auszuschließen. Unter Komplement versteht man eine Reihe von Proteinen des Serums, die an immunologischen Reaktionen teilnehmen. Diese könnten zur unspezifischen Präzipitation der Zellen führen. Komplement kann durch 30minütiges

Erhitzen auf 56° inaktiviert werden (Ishibashi, 1967). Trotzdem konnte keine Verringerung der Aggregation der F^{-} Zellen beobachtet werden.

Deswegen wurden die F Pilusspezifischen Antikörper aus dem Serum isoliert. Dazu wurden die F Pilusspezifischen Antikörper an F Pili, die sich auf einem Filter befinden, gebunden. Alle Antikörper, die nicht mit den Pili reagieren, können den Filter passieren. Die an F Pili gebundenen Antikörper hingegen können erst durch Waschen bei pH 2,5 entfernt werden. Die so gewonnenen Antikörperpräparate sind frei von Komplement und Antikörpern, die nicht gegen F Pili gerichtet sind. Deswegen läßt sich auch im Lichtmikroskop keine Agglutination der F^{-} Zellen feststellen. Eine gelelektrophoretische Untersuchung ergab zusätzlich, daß die isolierten Antikörper frei von jeglichen kontaminierenden Proteinen sind.

3.4.2. Immunologisch läßt sich nachweisen, daß F Pili an F^{-} Zellen binden.

Die oben beschriebenen gereinigten F Pilus Antikörperpräparate haben die Eigenschaft, F^{+} Zellen innerhalb einer Stunde vollkommen und F^{-} Zellen gar nicht zu präzipitieren. Deswegen scheint es sinnvoll, die Bindung der isolierten F Pili an F^{-} Zellen durch Zugabe der gereinigten Antikörper nachzuweisen. F^{-} Zellen sollten nur präzi-

pitierbar sein, falls sie vor der Serumzugabe F Pili gebunden haben. Die ermittelten Ergebnisse zeigt Tabelle 5.

	<u>Pseudomonas</u> <u>putida</u>	<u>Bacillus</u> <u>subtilis</u>	<u>Escherichia coli</u>		
			F	F	F
			JC3272	M1379	JE2217
mit Pili	-	-	++	+++	+
ohne Pili	-	-	-	-	-

Tabelle 5: Ergebnisse der immunologischen Tests auf Bindung isolierter F Pili an F⁻ Zellen.

Tabelle 5 zeigt die lichtmikroskopisch nachgewiesene Agglutination verschiedener Stämme mit und ohne F Piluszugabe nach Inkubation mit F Pilusspezifischen Antikörpern.

Um unspezifische Effekte der Geißeln und Typ I Pili auszuschließen, wurden drei F⁻ Stämme getestet, deren Eigenschaften genauer unter 2.3.1. beschrieben sind.

JC3272 ist begeißelt und trägt Typ I Pili (Achtman et al., 1971). M1379 ist unbegeißelt und trägt Typ I Pili, während JE2217 weder Geißeln noch Typ I Pili trägt. Eine Agglutination von +++ ist der eines Wildtyp F⁺ Stammes vergleichbar.

Im Falle der F Pilusbindung sah man mit dem Auge Flocken von Zellen und im Lichtmikroskop große Zellaggregate. Dort waren auch sehr viele Zellen, die an ungelöste F Piluskristalle gebunden hatten, zu erkennen. Wurden zu den F⁻ Zellen nur F Pili und Saline oder nur F Pilus Antiserum dazugegeben, lagen alle Zellen einzeln vor. Eine lichtoptische Aufnahme eines Bindungs- und Kontrollversuchs zeigt Abbildung 22.

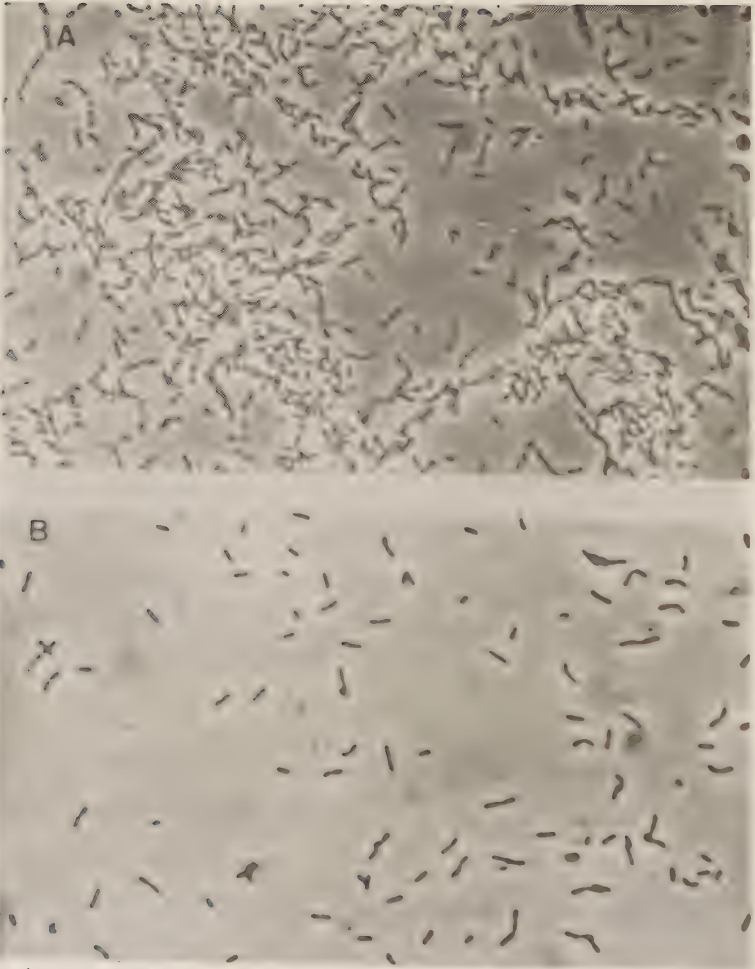


Abbildung 22 | Immunologischer Nachweis der Bindung
isolierter F Pili an F⁻ Zellen.

A: F⁻ Zellen + F Pili + Antikörper

B: F⁻ Zellen + Antikörper

Zusätzlich zu den E. coli F^- Stämmen wurden auch Bacillus subtilis und Pseudomonas putida getestet. Diese beiden Organismen können mit F^+ E. coli-Stämmen nicht konjugieren und eine spezifische F Pilusbindung ist deswegen nicht zu erwarten. Sie könnte nur auftreten, wenn die Pili eine allgemeine Tendenz zur Haftung an zellartige Strukturen haben. In beiden Fällen waren jedoch weder Zellaggregate noch Zellen, die an Piluskristalle gebunden hatten, festzustellen. Bei später durchgeführten Versuchen wurden die F Pili vor der Zugabe zu den F^- Zellen in Sucrose gelöst. Dadurch zeigte sich schon bei einer 3fach niedrigeren F Piluszugabe das oben beschriebene Ergebnis.

Bei allen durchgeführten Versuchen konnte kein Unterschied der Bindungsfähigkeit isolierter Wildtyp und Mutanten F Pili beobachtet werden.

3.4.3. Auch elektronenmikroskopisch läßt sich nachweisen, daß F Pili an F^- Zellen binden.

Die oben beschriebene immunologische Nachweismethode der Bindung der isolierten F Pili an F^- Zellen läßt nur qualitative Aussagen zu. Etwas mehr quantitative Aussagen gestattet das Elektronenmikroskop. Gleichzeitig stellt es eine überzeugende Bestätigung der Bindungsfähigkeit der isolierten F Pili dar.

Abbildung 23 zeigt die Verteilung der F Pili pro Zelle verschiedener E. coli F^- Kulturen, zu denen 3,5 ug F Pili eines Mutanten F Piluspräparates gegeben wurden. Außerdem wurden mit dieser Methode, wie beim immunologischen Test, Bacillus subtilis und Pseudomonas putida getestet.



Abbildung 23: Bindung isolierter F Pili an F^- Zellen. fla ohne Geißeln, pil ohne Typ I Pili.

Einige der bei diesem Experiment gezählten E. coli F^- Zellen zeigt Abbildung 24.

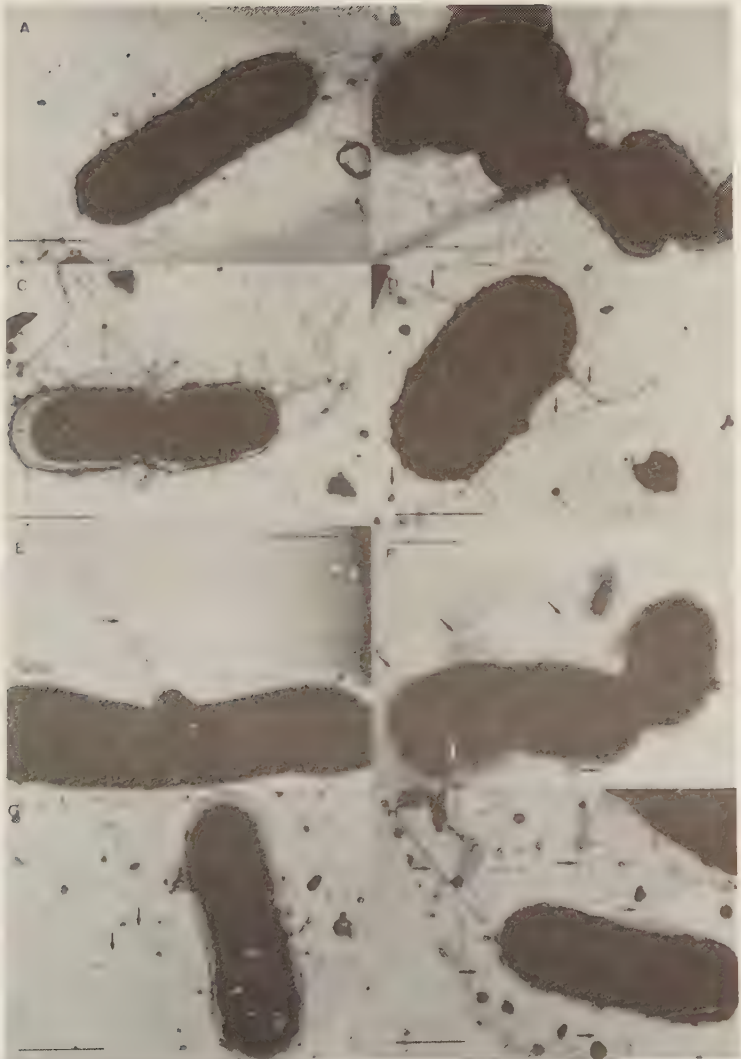


Abbildung 24: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Bindung isolierter F Pili an F⁻ Zellen.
A: F⁻ Zelle ohne F Piluszugabe.
Weitere Erläuterungen stehen im Text.

Obwohl eine Unterscheidung der F Pili von den Geißeln und Typ I Pili aufgrund der in der Einleitung beschriebenen morphologischen Kriterien möglich ist, wurden speziell beim elektronenmikroskopischen Bindungsnachweis auch F^- Stämme, die weder Geißeln (fla⁻) noch Typ I Pili (pil⁻) synthetisieren, verwendet. Dadurch ist bei der Auswertung eine Verwechslung der F Pili mit den Geißeln und Typ I Pili ausgeschlossen.

Abbildung 23 macht deutlich, daß bei allen drei F^- Stämmen eine Adsorption der Pili um durchschnittlich 2 F Pili pro Zelle stattfindet. Andere Resultate zeigen jedoch die nicht konjugierenden Spezies. Bei ihnen wird nur ein sehr niedriges Hintergrundniveau von 0,05 gebundenen F Pili pro Zelle gefunden. Im Falle der E. coli Zellen lassen sich nur sehr selten einzeln vorliegende, unadsorbierte F Pili beobachten, während das für die Kontrollen häufig der Fall ist.

Bei Versuchen dieser Art konnte zusätzlich die Beobachtung gemacht werden, daß auch die F Pili ungelöster F Piluskristalle an F^- Zellen binden können. Solch einen Fall zeigt Abbildung 25. Auf diese Art und Weise kann es zu einer Aggregatbildung von F^- Zellen und Piluskristallen kommen. Außerdem konnte beobachtet werden, daß die Zugabe der F Pili zu F^- Zellen zur Bildung von Bakterienaggregaten führte, bei denen die Zellen hauptsächlich einen "Wand-zu-Wand"-Kontakt zeigten (Abbildung 24 B und F). Diese Form der



Abbildung 25: Bindung zweier Zellen an einen F Pilus Kristall (Vergrößerung: 9000 x)

Zellaggregation wird am häufigsten bei konjugierenden E. coli Zellen beobachtet.

3.4.4. "Männlich spezifische" Bakteriophagen binden an F Pili.

Da die F Pili der Rezeptor der männlich spezifischen Bakteriophagen sind, wurden die isolierten F Pili auf ihre Fähigkeit, den RNA Phagen MS2 zu binden, getestet. Im Falle eines Wildtyp F Piluspräparats wurden 110 einzeln liegende F Pili nach Phagenzugabe ausgewertet und 42 % davon hatten männlich spezifische Phagen gebunden. Bei einem Mutanten F Piluspräparat lag diese Zahl bei 63 % von 127 gezählten F Pili. Qualitativ ähnliche Resultate konnten mit den beiden anderen Präparaten erzielt werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen männlich spezifischer Bakteriophagen, die an isolierte F Pili gebunden haben, zeigt Abbildung 26.

Die obigen Versuche zeigen, daß die isolierten F Pili sowohl an F^- Zellen binden als auch der Rezeptor für Bakteriophagen sind und in diesem Zusammenhang allen Voraussetzungen, die sich aus biologischen Experimenten mit F^+ Zellpopulationen ergeben, folgen. Aufgrund dieser beiden Kriterien liegt folglich eine biologische Aktivität der isolierten F Pili vor.

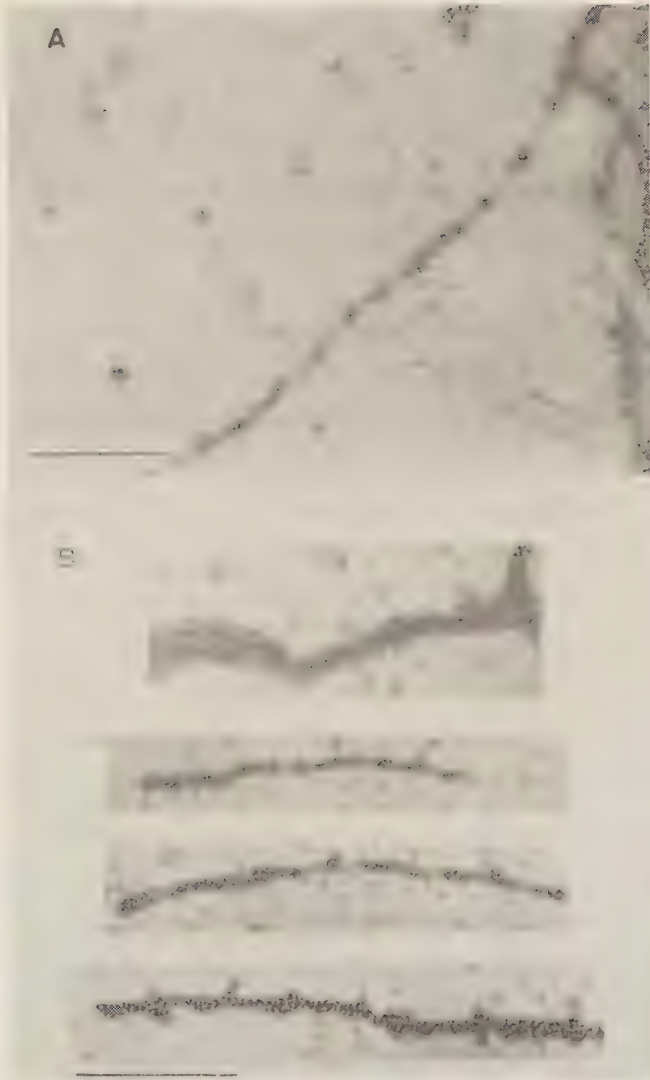


Abbildung 26: Bindung männlich spezifischer Bakteriophagen (MS2) an isolierte F Pili.
A: Übersichtsbild 25.000 x
B: Einzelne F Pili 31.000 x

4. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen an den F Sex Pili des Enterobacteriums Escherichia Coli hatten im wesentlichen drei Zielsetzungen:

- a) Die Entwicklung einer Methode zur Isolation biologisch aktiver F Pili.
- b) Die biochemische Charakterisierung der isolierten F Pili.
- c) Nachweis der biologischen Aktivität der isolierten F Pili.

4.1. Die F Pilusisolationismethode

Obwohl F Pili 1964 von Brinton entdeckt wurden, liegen bis heute trotz intensiver Bemühungen mehrerer Arbeitsgruppen nur sehr wenige Ergebnisse vor. Ein Grund dafür ist der Mangel einer leicht durchzuführenden, reproduzierbaren F Pilusisolationismethode (Tomoeda et al., 1976). Diese konnte bisher aus zwei Gründen nicht entwickelt werden. Erstens sind die F Pilusmengen in Wildtyp E. coli Kulturen zu gering, um quantitativ nachgewiesen werden zu können, und zweitens erschwert die Unlöslichkeit der F Piluskristalle die Abtrennung kontaminierender Strukturen.

In der hier beschriebenen Arbeit konnte die erste Schwierigkeit durch die Verwendung einer pilusüberproduzierenden

Mutante umgangen werden. Zusätzlich kann der F Pilusgehalt der Kultur durch eine Glucosezugabe nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase noch einmal verdoppelt werden. Diese Verdopplung und speziell die Verwendung der Mutante haben den entscheidenden Vorteil, bei der Entwicklung der F Pilusisolationismethode die Gelelektrophorese zur quantitativen Bestimmung der F Pilusmenge zuzulassen. Dieses Verfahren konnte bisher bei den verwendeten Wildtyp Stämmen nicht angewandt werden, da bei ihnen der F Pilingehalt einer Probe zu gering ist, um auf einem Gel von den kontaminierenden Proteinen unterschieden werden zu können. Auch in dieser Arbeit gelang der quantitative Nachweis des Wildtyp F Pilins erst nach der Entwicklung einer optimalen Isolationsmethode mit Hilfe der Mutante.

Die zweite Schwierigkeit konnte durch die ermittelte Löslichkeit der F Piluskristalle in 80%iger Sucrose umgangen werden.

Zusätzlich weist die hier beschriebene Isolationsmethode eine Reihe von Vorteilen auf, die sie speziell zur Isolation biologisch aktiver F Pili geeignet erscheinen läßt. Bei allen Schritten der Methode werden die entstandenen F Piluskristalle aus dem verworfenen Material reisoliert. Außerdem werden keine denaturierenden Agenzien verwendet und alle CsCl Dichtegradienten sind vorgeformt, um möglichst kurze Zentrifugationszeiten zu gewährleisten. Das auf die Dichtegradienten aufgetragene Material ist zu Ein-

zelpili gelöst, denn nur die Zentrifugation der Einzelpili gestattet eine Abtrennung der in die Kristalle eingeschlossenen Unreinheiten. Um eine möglichst hohe Ausbeute an F Pili zu erhalten, werden anschließend sowohl die freien als auch die zellgebundenen F Pili isoliert. Demgegenüber weisen die beiden publizierten Methoden zur Isolation von Sex Pili eine Reihe von Nachteilen auf.

Minkleys Methode unterscheidet sich im wesentlichen von der in dieser Arbeit beschriebenen dadurch, daß sie auf die Isolation der freien F Pili verzichtet (Minkley et al., 1976). Deswegen geht bei ihr ein großer Teil der Pili verloren. Außerdem werden die Pili nur aufgrund ihrer Dichte von kontaminierendem Material getrennt. Da die Kristalle vor der Zentrifugation im Dichtegradienten nicht aufgelöst werden, ist anzunehmen, daß in ihnen die verschiedensten kontaminierenden Strukturen eingeschlossen sind. Die Ausbeute an F Pili liegt mit 2 mg aus 10 l Kultur an der unteren Grenze der in dieser Arbeit beschriebenen F Pilusmengen. Da die Methode jedoch schon von 24 l Kultur ausgeht, scheint es nur schwer möglich, größere Ausbeuten zu erhalten.

Mit der von Beard (1972) beschriebenen Methode gelang es ihm, 5 mg R Pili aus 100 g Zellen (entsprechend ca. 12 l Kultur) zu isolieren. Es ist jedoch zu bedenken, daß der von Beard verwendete R^+ Stamm ca. 9 Pili pro Zelle mit

einer Länge von 10 μ m trägt. Aus diesem Grund liegt die Sex Pilusausgangsmenge mindestens sechsmal höher als im Fall einer F Pilusisolation. Für einen F⁺ Stamm wären folglich 0,8 mg F Pili aus 10 l Kultur zu erwarten. Schon aufgrund dieser niedrigen Ausbeute ist diese Methode zur Isolation von F Pili nicht zu empfehlen. Ihr Hauptnachteil besteht jedoch darin, daß die Piluskristalle zur Entfernung der kontaminierenden Zellen geschert werden und der letzte Reinigungsschritt in einer isoelektrischen Fokussierung besteht. Beide Schritte haben den Nachteil, die Struktur der Pili zu zerstören und sie dadurch speziell für biologische Experimente ungeeignet erscheinen zu lassen.

Aus diesen Gründen stellt die in dieser Arbeit beschriebene Methode eine leicht durchzuführende Routinemethode zur Isolation großer Mengen hochgereinigter, biologisch aktiver F Pili dar.

4.2. Biochemische Eigenschaften isolierter F Pili

Die gelelektrophoretischen Untersuchungen der Wildtyp und Mutanten F Pili zeigten, daß sie aus einer Untereinheit mit dem Molekulargewicht von 10750 d zusammengesetzt sind. Dieses Molekulargewicht ergibt sich auch aus dem Ergebnis der Aminosäureanalyse.

Brinton (1971) gab das Molekulargewicht der F Pilin Unter-
einheit mit 11800 d an. Seine Untersuchungsmethoden sind
jedoch unveröffentlicht, so daß es nicht möglich ist zu
entscheiden, wie exakt seine Angaben sind.

Die Dichte der F Pili konnte mit $1,200 \text{ g/cm}^3$ bestimmt wer-
den. Diesem Wert steht eine Reihe der widersprüchlichsten
Dichtebestimmungen gegenüber. Wendt et al. (1966) legten
die Dichte der F Pili mit $1,197 \text{ g/cm}^3$, Brinton (1971) mit
 $1,257 \text{ g/cm}^3$, Beard et al. (1972) mit $1,296 \text{ g/cm}^3$ und Tai
(zitiert in Tomoeda et al., 1976) mit $1,232 \text{ g/cm}^3$ fest.
Diese widersprüchlichen Angaben lassen sich mit dem in
dieser Arbeit gewonnenen Ergebnis, daß die Dichte der F
Pili vom Gehalt an kontaminierenden Proteinen abhängt,
erklären. Es ist dabei auffällig, daß nur die von Wendt
(1966) ermittelte Dichte von $1,197 \text{ g/cm}^3$ der in dieser
Arbeit ermittelten von $1,200 \text{ g/cm}^3$ nahekommt. Beide Ar-
beiten haben gemeinsam, daß für die Dichteanalyse keine
Piluskristalle, sondern Einzelpili verwendet wurden.
Wendt benutzt für seine Analyse unkonzentrierte Pili des
Überstandes einer Kultur. In diesem Fall ist die Konzen-
tration der Pili so gering, daß nur wenige in Kristallen
vorliegen. In dieser Arbeit wurden die Piluskristalle vor
der Analyse in Sucrose gelöst, um einzelne Pili zu erhal-
ten. In allen anderen der oben aufgeführten Arbeiten wur-
den lediglich mehr oder weniger gereinigte Piluskristalle
zur Dichtebestimmung verwendet. Diese weisen jedoch je

nach der Menge der in die Kristalle eingeschlossenen Verunreinigungen unterschiedliche Dichten auf. Deswegen läßt die von Brinton (1971) beschriebene Dichte von $1,257 \text{ g/cm}^3$ darauf schließen, daß seiner Analyse ein verunreinigtes Präparat zugrunde lag.

Bei den ermittelten Werten der Aminosäureanalyse fällt am meisten der hohe Anteil hydrophober Aminosäuren auf. Durch ihn kann sowohl die große Tendenz der Pili, in wässrigen Lösungen Aggregate zu bilden, als auch deren Löslichkeit in Sucrose erklärt werden.

Die erhaltenen Präparate konnten weiterhin gelelektrophoretisch auf ihren Gesamtproteingehalt untersucht werden. Dabei ließ sich zeigen, daß im Fall eines Wildtyp F Piluspräparates mehr als 99 % des Proteins und im Fall eines Mutanten Präparates mehr als 90 % des Proteins in der F Pilusbande vorlagen. Es ist jedoch anzunehmen, daß die tatsächliche Reinheit der Präparate höher liegt, da in die Mengenberechnung des kontaminierenden Proteins auch das Material mit sehr hohem Molekulargewicht am Anfang eines in Bezug auf die F Pili überladenen Gels miteinbezogen wurde. Alle Hinweise sprechen dafür, daß es sich bei diesem Material um denaturierte F Piluskristalle handelt. Es fehlt jedoch ein positiver Beweis dafür.

Lugtenberg (persönliche Mitteilung) konnte in einem Milligramm der nach der beschriebenen Methode isolierten F Pili nur 9 µg Lypopolysaccharid nachweisen. Außerdem läßt die geringe Dichte der isolierten F Pili einen hohen Nucleinsäuregehalt des Präparats unwahrscheinlich erscheinen. Aus diesen Gründen scheinen die Piluspräparate frei von nennenswerten Verunreinigungen anderer Zellkomponenten zu sein.

Obwohl die F Pili nur aus einer Proteinuntereinheit bestehen, scheinen 9 Cistren des tra Operons an dessen Synthese beteiligt zu sein. Das läßt darauf schließen, daß die Synthese eines Pilus ein komplexer Vorgang ist und das Zusammenwirken vieler Proteine in der Zelle voraussetzt. Brinton hat gezeigt, daß ein Monomer des F Pilins zwei Phosphat- und einen D Glucose-Rest trägt (1971). Deswegen sind unter den Produkten der an der F Pilussynthese beteiligten Cistren, Enzyme mit einer phosphorylierenden und glucosylierenden Aktivität zu erwarten. Andere dieser erwähnten Cistren könnten auch an der Bildung einer Basalstruktur beteiligt sein. Solche Basalstrukturen sind für die Geißeln einiger Spezies beschrieben worden (Depamphilis und Adler, 1971).

4.3. Die Bedeutung der biologischen Aktivität isolierter F Pili

Bei der Entwicklung der hier beschriebenen F Pilus Isolationsmethode war die Verwendung einer deregulierten, F Pilus überproduzierenden Mutante von großem Nutzen. Die isolierten Pili dieser Mutante zeigten bis auf ihre erhöhte Kristallisationsfähigkeit bei allen biochemischen und biologischen Untersuchungen das gleiche Verhalten wie die Pili des Wildtyps. Außerdem zeigen sie ähnliche antigene Eigenschaften. Dieses Ergebnis läßt eine Mutation in dem Strukturgen des F Pilins unwahrscheinlich erscheinen, da die Auswirkungen auf die Struktur des Pilus haben sollte. Dagegen sprechen auch die Ergebnisse der Komplementationsanalysen. Sie zeigen, daß sowohl Cistren auf der Plasmidchimäre pRS27 als auch auf pRS29 den genetischen Defekt der Mutante komplementieren können. Es ist dabei auffällig, daß pRS27 und pRS29 nur das EcoRI Restriktionsfragment 15 des F Faktors gemeinsam tragen (siehe Abbildung 5). Dieses Ergebnis läßt sich deswegen dahingehend interpretieren, daß ein Cistron auf Fragment 15 mutiert ist. Dieses müßte entweder für ein Protein codieren, das bei der Regulation des Piluswachstums eine Rolle spielt oder die Retraktion (Novotny und Fives-Taylor, 1974; Jacobson, 1972) der F Pili blockieren, so daß es zu einer Pilusüberproduktion kommt.

Eine alternative Erklärung für das Verhalten der Mutante wäre das Vorliegen einer Doppelmutation, die es jedoch erlaubt, schon bei der Komplementation nur eines Mutationsortes den Wildtyp Phänotyp wiederherzustellen. In solch einem Fall additiv wirkender Gene wäre auch die Möglichkeit gegeben, die vermehrte Produktion der F Pili nach erneuter Mutagenese zu erhöhen.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde, sind F Pili für den Ablauf der bakteriellen Konjugation absolut notwendig. Ihre Rolle bei diesem Vorgang ist jedoch weitgehend unbekannt. Deswegen wurde an die isolierten F Pili die Anforderung gestellt, biologisch aktiv zu sein. Als Kriterium für diese biologische Aktivität galt sowohl die in mehreren Modellen über den Konjugationsprozeß postulierte Bindung der F Pili an F^- Zellen als auch ihre Rezeptorfunktion für Phagen.

Die Fähigkeit der isolierten F Pili, an F^- Zellen zu binden, konnte sowohl elektronenmikroskopisch als auch immunologisch nachgewiesen werden. Mit beiden Methoden kann eine Bindung der Pili nur an E. coli Stämme und nicht an Bacillus subtilis oder Pseudomonas putida beobachtet werden.

Es ist jedoch zu bedenken, daß diese Ergebnisse lediglich das Vorliegen einer unspezifischen Bindung der F

Pili an zellartige Strukturen ausschließen. Es stellt keinen positiven Beweis einer Bindungsfähigkeit der isolierten F Pili an F^- Zellen, die der in vivo Situation gleichkommt, dar. Solch ein positiver Beweis einer spezifischen Bindung könnte nur durch den Nachweis erbracht werden, daß eine F^- Mutante, die die isolierten Pili nicht mehr bindet, auch in vivo kein Rezipient für F^+ Zellen ist. Solche F^- Mutanten könnten durch eine Immunpräzipitation der F^- Zellen nach F Piluszugabe im Überstand des Präzipitates angereichert und isoliert werden.

Jedoch schon die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse lassen das Vorliegen von Artefakten nahezu ausgeschlossen erscheinen. Beim immunologischen Nachweis der Bindungsfähigkeit gibt es kaum eine andere Erklärung als die F Pilusbindung, die begründet, warum F^- Zellen nur nach Zugabe der F Pili und hochgereinigten F Pilusantikörper präzipitiert werden können.

Für den elektronenmikroskopischen Nachweis der F Pilusbindung hätte man beim Vorliegen eines Trocknungsartefaktes erwartet, daß die Zahl der zellgebundenen F Pili bei E. coli F^- und den anderen Stämmen gleich ist. Statt dessen wurde jedoch ein signifikanter Unterschied in der Zahl der gebundenen F Pili pro Zelle festgestellt. Dadurch ist es zum ersten Mal gelungen, den in allen Konjugationsmodellen postulierten Schritt der F Pilusbindung an die Rezipientenzelle experimentell nachzuweisen.

In Brintons Modell (Brinton, 1965; 1971) dient der F Pilus als treibende Kraft der DNA Übertragung. Deswegen setzt es eine F Pilusverbindung der an der Konjugation teilnehmenden Zellen voraus. Marvin und Hohn (1969) und Curtiss (1969) müssen bei ihrem Modell solch eine Bindung annehmen, da der Pilus bei ihnen die Aufgabe hat, die Rezipienten und Donatorzellen in einen Zellwandkontakt zu bringen. Der in dieser Arbeit gelieferte Nachweis der Bindungsfähigkeit isolierter F Pili an F^- Zellen kann allein noch nicht zur Klärung des Konjugationsmechanismus beitragen. Die entwickelten Methoden schaffen jedoch die Voraussetzung dafür, Fragen nach grundlegenden Mechanismen der Konjugation zu beantworten.

Eine davon ist die Frage nach der Existenz eines F Pilus-rezeptors auf der Zellwand des Rezipienten. Denn die gezeigte F Pilusbindung kann sowohl unspezifisch an der gesamten Zelloberfläche als auch spezifisch an einer bestimmten Bindungsstelle stattfinden. Deswegen können die isolierten F Pili zur Isolation der F Pilus bindenden Zellwandkomponenten der F^- Zelle verwendet werden. Außerdem bietet sich die Möglichkeit an herauszufinden, ob die schlechte Rezipientenfähigkeit ("Surface Exclusion") der F^+ Zellen darauf zurückzuführen ist, daß F Pili nicht mehr gebunden werden können. Die gleiche Frage stellt sich für die in mehreren Laboratorien isolierten Con^- Mutanten (Skurray et al., 1974; Henning und Haller, 1975; Havekes und Hoekstra, 1976). Diese

F^- Zellen können nicht mehr mit F^+ Stämmen konjugieren. Mit Hilfe der isolierten biologisch aktiven F Pili ist es nun möglich festzustellen, ob diese Mutanten keine Rezipienten mehr sind, da sie keine F Pili mehr binden, oder ob sie in späteren Stufen des Konjugationsprozesses blockiert sind.

Da sich elektronenmikroskopisch nachweisen ließ, daß ein großer Teil der isolierten F Pili noch Rezeptor für männlich spezifische Phagen sind, ist auch das zweite Kriterium für eine biologische Aktivität der Pili erfüllt. Dieses Ergebnis bietet die Möglichkeit, wichtige Fragen über den Infektionsprozeß einer F^+ Zelle durch Bakteriophagen zu beantworten.

Mehrere Modelle über den Infektionsprozeß einer F^+ Zelle mit männlich spezifischen Bakteriophagen setzen eine Bindung des A Proteins (Weber und Königsberg, 1975) der Phagenhülle an F Pili voraus (Roberts und Steitz, 1967; Valentine und Strand, 1965). Diese Bindung könnte durch in vitro Versuche mit isolierten Komponenten nachgewiesen werden.

Außerdem würde die Beantwortung der Frage, ob die Adsorption der Phagen an isolierte F Pili zur Freisetzung der Phagennucleinsäure führt, Aufschluß darüber geben, ob die Freisetzung der Phagen DNA oder RNA ein Prozeß ist, der unter Energieverbrauch stattfindet.

5. Zusammenfassung

Es wurde eine leicht durchzuführende, reproduzierbare Methode zur Isolation biologisch aktiver F Pili entwickelt. Durch die Verwendung einer Mutante, die mehr F Pili als der Wildtyp trägt, konnte die Gelelektrophorese zur quantitativen Bestimmung des F Pilusgehaltes eingesetzt werden. Der Mutationsort dieser Mutante liegt im tra Operon des F Faktors.

Mit der so entwickelten Methode konnten 2 mg Wildtyp F Pili von 99 % Reinheit isoliert werden. Die Ausbeute an Mutanten F Pili lag bei 7 mg von 90 % Reinheit.

Die durchgeführten biochemischen Untersuchungen zeigten keinen Unterschied zwischen den Wildtyp und Mutanten F Pili. In beiden Fällen liegt die Dichte der Pili bei $1,200 \pm 0,002$ g/cm³ und sie setzen sich nur aus einer Proteinuntereinheit zusammen. Das Molekulargewicht dieser Untereinheit liegt bei 10.750 d. Die durchgeführte Aminosäureanalyse ergab einen sehr hohen Anteil hydrophober Aminosäuren. Es fehlen Histidin, Arginin und Prolin.

Die biologische Aktivität isolierter F Pili, an F⁻ Zellen zu binden, läßt sich sowohl elektronenmikroskopisch als auch immunologisch nachweisen. Die F Pilusbindung erfolgt nur an Escherichia coli Zellen und nicht an Pseudomonas putida und Bacillus subtilis.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß mehr als 50 % der isolierten F Pili noch als Rezeptor für "männlich spezifische" Bakteriophagen dienen und folglich auch in dieser Hinsicht biologisch aktiv sind.

6. Literatur

- Achtman, M. (1975): Mating aggregates in Escherichia coli conjugation. J. Bacter. 123, 505-515
- Achtman, M. (1976): The mating phenomenon in Escherichia coli. In: Surface membrane receptors. Ed. Bradshaw, R.A., Frazier, W.A., Merrell, R.C., Gottlieb, D.J., Hogue-Angeletti, R.A., Plenum publishing corporation New York
- Achtman, M., Willetts, N., Clark, A.J. (1971): Beginning a genetic analysis of conjugational transfer determined by the F factor in E. coli by isolation and characterization of transfer-deficient mutants. J. Bacter. 106, 529-538
- Achtman, M., Willetts, N., Clark, A.J. (1972): A conjugational complementation analysis of transfer-deficient mutants of Flac in E. coli. J. Bacter. 110, 831-842
- Beard, J.P., Howe, T.G.B., Richmond, M.H. (1972 a): Centrifugation properties of sex pili. J. molec. Biol. 66, 311-313
- Beard, J.P., Howe, T.G.B., Richmond, M.H. (1972 b): Purification of sex pili from Escherichia coli carrying a derepressed F-like R factor. J. Bacter. 111, 814-820
- Berg, H.C., Anderson, R.A. (1973): Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. Nature 245, 380-382
- Bradley, D.E. (1974): Adsorption of bacteriophages specific for Pseudomonas aeruginosa R factors RP1 and R1822. Biochem. Biophys. Res. Comm. 57, 893-900
- Bradley, D.E., Cohen, D. R. (1976): Basic characterization of W-Pili. J. Gen. Microbiol. 97, 91-103

- Brinton, C.C. (1959): Non-flagellar appendages of bacteria.
Nature 138, 782-786
- Brinton, C.C. (1965): The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria.
Trans. N.Y. Acad. Sci. 27, 1003-1054
- Brinton, C.C., Gemski, P., Carnahan, J. (1964): A new type of bacterial pilus genetically controlled by the fertility factor of E. coli K-12 and its role in chromosome transfer.
Genetics 52, 776-783
- Brinton, C.C. (1971): The properties of sex pili, the viral nature of "conjugal" genetic transfer systems, and some possible approaches to the control of bacterial drug resistance. Critical Rev. Microb. 1, 105-160
- Caro, L.G., Schnös, M. (1966): The attachment of the male-specific bacteriophage f1 to sensitive strains of E. coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 56, 126-132
- Crawford, E.M., Gesteland, R.F. (1964): The adsorption of bacteriophage R17. Virology 22, 165-167
- Curtiss, R., Charamella, L.J., Stallions, R.D., Mays, J.A. (1968): Parental functions during conjugation in Escherichia coli K-12. Bacter. Rev. 32, 320-348
- Curtiss, R. III (1969): Bacterial conjugation.
Annu. Rev. Microb. 23, 69-136
- Harden, V., Meynell, E. (1972): Inhibition of gene transfer by antiserum and identification of serotypes of sex pili.
J. Bacter. 109, 1067-1074
- Havekes, L.M., Hoekstra, W.P.M. (1976): Characterization of an Escherichia coli K-12 F⁻ Con⁻ mutant.
J. Bacter. 126, 593-600

- Helmuth, R., Achtman, M. (1975): Operon structure of DNA transfer cistrons on the F Sex factor. Nature 257, 652-656
- Henning, U., Haller, J. (1975): Mutants of Escherichia coli K-12 lacking all "major" proteins of the outer cell envelope membrane. FEBS Letters 55, 161-164
- Ishibashi, M. (1967): The pilus as f^+ antigen. J. Bacter. 93, 379-389
- Iyobe, S., Mitsuhashi, S., Saito, T. (1973): Sex Pili mutants isolated by macarabomycin treatment. Antimicrobial agents and chemotherapy 3, 614-620
- Jacobson, A. (1972): Role of F Pili in the penetration of bacteriophage $\phi 1$. J. Virol. 10, 835-843
- Khatoon, H., Iyer, R.V., Iyer, V.N. (1972): A new filamentous bacteriophage with sex factor specificity. Virology 48, 145-155
- Kline, B.C. (1976): Pili, Plasmids, and microbial virulence. Mayo Clinic. Proc. 51, 3-5
- Lawn, A.M., Meynell, G.G., Meynell, E., Datta, N. (1967): Sex pili and the classification of sex factors in the Enterobacteriaceae. Nature 216, 343-346
- Lawn, A.M., Meynell, E. (1972): Serotypes of sex pili. J. Hyg. Camb. 68, 683-694
- Lederberg, J., Tatum, E.L. (1946): Novell genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 113-114
- Leifson, E. (1960): Atlas of bacterial flagellation, p. 3-7, Academic press Inc., New York
- Macnab, R.M. (1976): Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy. J. clinic. Microbiol. 4, 258-265

- Marvin, D., Hohn, B. (1969): Filamentous bacterial viruses. Bact. Rev. 33, 172-209
- Meynell, G.G., Lawn, A.M. (1967): Sex pili and common pili in conjugational transfer of colicin factor Ib by Salmonella typhimurium. Genet. Res. Camb. 9, 359-367
- Meynell, E., Meynell, G.G., Datta, N. (1968): Phylogenetic relationship of drug resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. Bact. Rev. 32, 55-83
- Minkley, E.G., Polen, S., Brinton, C.C. (1976): Identification of the structural gene for F Pilin. J. molec. Biol. 108, 111-121
- Moore, S., Stein, H. (1963): Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. Meth. Enzymol. 6, 819-831
- Novotny, C., Fives-Taylor, P. (1974): Retraction of F Pili. J. Bacter. 117, 1307-1311
- Novotny, C., Lavin, K. (1971): Some effects of temperature on the growth of F Pili. J. Bacter. 107, 671-682
- Novotny, C., Carnahan, J., Brinton, C.C. (1969): Mechanical removal of F pili, type I pili and flagella from Hfr and RTF donorcells and the kinetics of their reappearance. J. Bacter. 112, 1083-1089
- Novotny, C., Knight, W.S., Brinton, C.C. (1968): Inhibition of bacterial conjugation by ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid male-specific bacteriophages. J. Bacter. 95, 314-326
- Ørskov, I., Ørskov, V. (1960): An antigen termed f^+ occurring in F^+ E. coli strains. Acta pathologica et microbiologica scandinavica 48, 37-46

- Ottow, J.C.G. (1975): Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. Ann. Rev. Microb. 29, 79-129
- Ou, J.T., Anderson, T.F. (1972 a): Effect of $2n^{2+}$ on the adsorption of male specific filamentous deoxyribonucleic acid and isometric ribonucleic acid phages. J. Cell. Comp. Physiol. 60, 199-208
- Ou, J.T., Anderson, T.F. (1972 b): Effect of $2n^{2+}$ on bacterial conjugation: Inhibition of mating-pair formation. J. Bacter. 111, 177-185
- Ou, J.T. (1973): Inhibition of formation of Escherichia coli mating pairs by f_1 and MS2 bacteriophages as determined with a coulter counter. J. Bacter. 114, 1108-1115
- De Pamphilis, M.L., Adler J. (1971): Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from Escherichia coli and Bacillus subtilis. J. Bacter. 105, 384-395
- Roberts, J., Steitz, J.E.A. (1967): The reconstitution of infective bacteriophage R17. Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.) 58, 1416-1421
- Silverman, M., Simon, M. (1973): Genetic analysis of flagellar mutants in Escherichia coli. J. Bacter. 113, 105-113
- Skurray, R.A., Hancock, R.E.W., Reeves, P. (1974): Con^- mutants: class of mutants in Escherichia coli K-12 lacking a major cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage. J. Bacter. 119, 726-735
- Skurray, R.A., Nagaishi, H., Clark, A.J. (1976): Molecular cloning of DNA from F sex factor of Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 73, 64-68

- Smith, R.W., Koffler, H. (1971): Bacterial flagella.
Advances in Microbial Physiology 6, 219-339.
Academic Press London and New York
- Stirms, S., Ørskov, I., Ørskov, F. (1966): K88, an episome-determined protein antigen of Escherichia coli.
Nature 209, 507-508
- To, C.M., To, A., Brinton, C.C. (1975): A new epiviral pilus, the E pilus, and a new RNA pilus phage pilE/R1.
Abstract of the annual meeting of the American society for microbiology, p. 259, Washington: American society for microbiology.
- Tomoeda, M., Inuzuka, M., Date, T. (1975): Bacterial Sex Pili. Prog. Biophys. Molec. Biol. 30, 23-56
- Valentine, R.C., Strand, M. (1965): Complex of F Pili and RNA bacteriophage. Science 148, 511-512
- Weber, K., Osborne, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dedecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
- Weber, K., Konigsberg, W. (1975): Proteins of RNA Phages.
In: "RNA phages". Ed. Norton Zinder. Cold Spring Harbor Laboratories.
- Wendt, L.W., Ippen, K.A., Valentine, R. (1966): General properties of F Pili. Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 375-380
- Willetts, N. (1973): Characterisation of the F transfer cistron traL. Genet. Res. Camb. 21, 205-213

7. Appendix

7.1. Die F Pilusisolationsmethode

Wachstum und Ernte der Ausgangskulturen

Zu 10 l Thy Broth wurden 5×10^7 Zellen des Ausgangsstamms zur F Pilusisolation gegeben und diese Kultur in einem 12 l fassenden Microferm Fermentor (New Brunswick Scientific) bei 37° inkubiert. Dabei wurde die Kultur mit 8 l Luft/min und 500 rpm heftig belüftet. Um ein Übersäumen der Kultur zu verhindern, wurden beim Ansatz der Kultur 0,5 ml Antischaum zugesetzt. Nach ca. 10 h Inkubation wurde der Verlauf des Wachstums mit dem Coulter Counter verfolgt und am Übergang der exponentiellen zur stationären Phase 100 ml 40 % Glucose zur Kultur gegeben. Diese wurde dann nochmals innerhalb von 4 h bis zum Anfang der stationären Phase inkubiert und durch Zugabe von ca. 1 l Eis und Umsetzen in einen mit Eiswasser gefüllten Eimer schnell gekühlt.

Trennung der Zellen vom Medium der Kultur

So schnell wie möglich nach der Ernte der Kultur wurde sie in einem Sorvall Durchflußrotor SZ14 bei 15.000 rpm, 0° und einer Durchflußrate von 300 ml/min zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden auch die im Rotor verbleibenden 1,2 l durch eine Zentrifugation im GSA Rotor, bei 8.000 rpm für 10 min und 0° von den Zellen getrennt. Der resultierende Überstand dieser Zentrifugation

wurde anschließend zu den restlichen 10 l des Durchflusses des Rotors gegeben.

Isolation der freien F Pili

Vom Überstand der Durchflußzentrifugation werden 10 l in einem Becherglas abgemessen und der Rest verworfen. Daraufhin wird der pH mit 1 N HCl auf 7,2 eingestellt und die Magnesiumionenkonzentration durch Zugabe von 10 ml 1 M $MgCl_2$ auf 1 mM gebracht. Als nächstes werden Polyethylenglycol 6000 (Endkonzentration 2 %) und NaCl (Endkonzentration 0,5 M) im Überstand gelöst. Das geschieht durch einständiges starkes Rühren mit dem Magnetrührer. Danach bleibt das Becherglas ca. 14 h bei 4° stehen. Die durch das PEG entstandenen F Pilus Aggregate werden im anschließenden Schritt durch achtmalige Zentrifugation in 12 GSA Zentrifugenbechern bei 11.000 rpm und 0° für 20 min konzentriert. Nach jeder Zentrifugation wird der Überstand verworfen und der Zentrifugenbecher neu gefüllt. Der Überstand der letzten Zentrifugation wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, damit keine Restflüssigkeit im Becher verbleibt.

Isolation der zellgebundenen F Pili

Die als Sediment der Durchflußzentrifugation gewonnenen ca. 80 g Zellen werden mit 30 %iger Sucrose auf ca. 200 ml gebracht und 60 min bei 37° mit einem Magnetrührer stark gerührt. Tomoeda (1975) konnte zeigen, daß mit dieser Methode ca. 90 % aller zellgebundenen F Pili von den Zellen abge-

löst werden können. Bei der hier entwickelten Methode können sie dann in einem CsCl Stufengradienten aufgrund ihrer geringeren Dichte von den Zellen abgetrennt werden. Dazu werden auf 4 Stufengradienten des Typs I (siehe Tabelle 2) je 50 ml der resuspendierten Zellen geladen und diese bei 5000 rpm in einem Sorvall HS4 Rotor bei 15° für ca. 14 h zentrifugiert. Anschließend wird die F Pilusbande und das Material darüber vom Gradienten abgesaugt und mit Tris-EDTA auf 1 l Endvolumen aufgefüllt. Darauf folgt auch hier eine Präzipitation der einzelnen F Pili und Kristalle durch Zugabe von PEG und NaCl für 8 h bei 4°. Das Präzipitat wird dann für 30 min bei 0° und 11.000 rpm in vier Zentrifugenbechern im Sorvall GSA Rotor zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Sowohl das PEG Präzipitat der freien F Pili als auch das der zellgebundenen Pili enthält noch einige Zellen und Zellbruchstücke. Diese stellen die "partikulären Kontaminanten" des F Piluspräparates dar.

Abtrennung partikulärer Kontaminanten

Zum Auflösen der Kristalle werden die gewonnenen Sedimente der 16 GSA Zentrifugenbecher in je 3 ml 80 % Sucrose resuspendiert. Zu diesem Zweck werden die Zentrifugenbecher auf einem Gyrotory Inkubator (New Brunswick Scientific) über Nacht bei 4° und 350 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die 48 ml der in 80%iger Sucrose gelösten Pili vereinigt und die 16 GSA Zentrifugenbecher zweimal mit 2,5 ml Tris-

EDTA ausgewaschen. Sucrose und Tris-EDTA wurden dann vermisch und für 45 min bei 6000 rpm und 0° in einem Sorvall GSA Rotor zentrifugiert. Diese Zentrifugation findet also in 128 ml 30%iger Sucrose statt.

Reisolation der F Pili

Ein Teil der während der Zentrifugation entstandenen F Pilusaggregate sedimentiert zusammen mit den partikulären Kontaminanten. Diese F Pili müssen reisoliert werden. Dazu wird das Pellet in 18 ml 80%iger Sucrose für 2 h durch Magnetrühren bei 4° resuspendiert und der GSA Zentrifugenbecher nach der Resuspension mit 36 ml Tris-EDTA ausgewaschen. Je 9 ml der vereinigten Sucrose und Tris-EDTA werden dann auf 6 CsCl Stufengradienten (Typ II) in Nitrocellulose Röhrchen geladen. Die Gradienten zentrifugierten in einem SW27 Rotor für 3 h bei 12.000 rpm und 15°. Nach dieser Zentrifugation sieht man eine starke F Pilusbande, die deutlich von den Zellen und Vesikeln des Sediments getrennt ist.

Das Material der F Pilusbande und darüber wird gesammelt und mit dem zellfreien Überstand vereinigt.

Trennung der F Pili von löslichen Kontaminanten

Die löslichen Kontaminanten können durch Rekrystallisation der gelösten Piluskristalle abgetrennt werden. Dazu werden die ca. 150 ml des Präparates 5 x 12 h hängend gegen 2 l Tris-EDTA bei 4° dialysiert. Während dieser Dialyse kristallisieren die F Pili zu sehr großen Kristallen, die

dann in dem hängenden Dialyseschlauch (Durchmesser 3 cm) zu Boden sinken. Aus diesem Grund sind alle Erschütterungen bei diesem Reinigungsschritt zu vermeiden. Das flockige leichte Sediment kann danach durch Anstechen des Dialyseschlauches kurz über dem Sediment und Abfließen des Materials darüber von den löslichen Kontaminanten getrennt werden. Die im Dialyseschlauch verbleibenden ca. 20 ml werden in ein 38 ml fassendes Nitrozellulose Zentrifugenröhrchen gefüllt und in einem Sorvall HB4 Schwingbecherrotor bei 4000 rpm und 0° für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene lockere Pellet kann durch Absaugen des Überstandes mit einem Piläusball von diesem getrennt werden.

Hochgeschwindigkeits CsCl Dichtegradient

Das Pellet der HB4 Zentrifugation wird nach Zugabe von 16 ml 80%iger Sucrose durch langsames Rühren mit einem Magnetrührer bei 4° ca. 14 h lang resuspendiert. Danach wird das Zentrifugenröhrchen mit Tris-EDTA ausgewaschen und das Volumen des Präparates damit auf 42 ml gebracht. Hiervon werden je 7 ml auf 6 CsCl Stufengradienten (Typ III) geladen. Danach wurde in einem SW27 Rotor für 20 h bei 22.000 rpm und 15° zentrifugiert. Die F Pilusbande wird mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und 3 x 12 h gegen 1 l Tris-EDTA bei 4° dialysiert. Die entstandenen Kristalle können dann bei 3000 rpm und 0° binnen 10 min locker sedimentiert und vom Überstand getrennt werden. Das erhaltene Pellet wird daraufhin in 5 - 7 ml Tris-EDTA durch leichtes Schütteln mit der Hand resuspendiert und stellt das Endpräparat dar.

Lebenslauf

- 16.8.1950 wurde ich als Sohn des Prokuristen Franz Helmuth und seiner Ehefrau Lotte Helmuth in Andernach am Rhein geboren.
- 1954 Umzug nach Berlin.
- 1956 Besuch der 12.Grundschule in Berlin-Lankwitz.
- 1963 Umschulung auf die Walther-Rathenau-Schule in Berlin-Wilmersdorf.
- 1970 Abitur und Beginn des Studiums der allgemeinen Biologie und Genetik an der FU Berlin.
- 1972 Vordiplom und Beginn der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in der Abteilung Trautner. Titel der Arbeit: "Die Operonstruktur der tra Region des Flac Sex Faktors in Escherichia coli K-12".
- 1974 Diplomhauptprüfung und Beginn der Dissertation am gleichen Institut.

